Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik - Klinik A -
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. W. Schneider)

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin und Digoxin bei chronischer Nieren- und Lebererkrankung

Habilitationsschrift

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
zur Erlangung der venia legendi für das Fach Innere Medizin
vorgelegt

von
Uwe Peters
1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544328_0009

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik - Klinik A -
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Professor Dr. W. Schneider)

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin und Digoxin bei chronischer Nieren- und Lebererkrankung

Habilitationsschrift

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf zur Erlangung der venia legendi für das Fach Innere Medizin vorgelegt

von
Uwe Peters
1978

Untersuchungen zur Pharmakokinetik
von Digitoxin und Digoxin bei
chronischer Nieren- und Lebererkrankung

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. Einleitung 1
   1.1. Nachweismethoden für Digitoxin und Digoxin.... 1
   1.2. Chemische Struktur und Kardioaktivität von Digitoxin, Digoxin und seinen Metaboliten 4

2. Fragestellung 7

3. Methodik 8
   3.1. Prinzip des Radioimmunoassays 8
   3.2. Herstellung eines Antiserums gegen Digitoxin.. 1o
      3.2.1. Substanzen und Reagenzien..... 1o
      3.2.2. Kopplung von Digitoxin an Rinderalbumin 11
      3.2.3. Immunisierung von Kaninchen..... 13
   3.3. Voruntersuchungen zur Aufstellung eines Radioimmunoassays für Digitoxin..... 15
      3.3.1. Nachweis von Digitoxin-Antikörpern..... 15
      3.3.2. Prüfung der Spezifität des Digitoxin-Antikörpers..... 17
      3.3.3. Bestimmung der Bindungskapazität des Digitoxin-Antiserums..... 19
      3.3.4. Bestimmung der Äquilibriumskonstante des Digitoxin-Antikörperkomplexes..... 2o
      3.3.5. Einfluß des Serumvolumens und der Albuminkonzentration im Inkubationsansatz auf die Antikörperbindung von Digitoxin..... 23
      3.3.6. Einfluß der Bilirubinkonzentration in der Serumprobe auf den Radioimmunoassay von Digitoxin..... 24

Seite

3.3.7. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Assoziationskinetik des Antikörpers an Digitoxin 25
3.3.8. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Dissoziationskinetik des Digitoxin-Antikörperkomplexes 26
3.3.9. Trennung des antikörpergebundenen vom freien Digitoxin mit Dextran-beschichteter Holzkohle 27
3.4. Aufstellung eines Radioimmunoassays für Digitoxin 29
3.4.1. Herstellung des Rinderserumalbumin-Phosphatpuffers, der Digitoxinstandardlösung, der ^{3}H-Digitoxin-Stammlösung und der Digitoxin-Antikörperverdünnung 29
3.4.2. Pipettierschema beim Digitoxin-RIA 3o
3.4.3. Analysenvorgang bei der Bestimmung einer Serumprobe 3o
3.4.4. Eichkurvenverlauf bei der Bestimmung der Serumdigitoxinkonzentration 32
3.5. Mathematische Tranformation der Eichkurve in eine Gerade 32
3.6. Empfindlichkeit der Digitoxinbestimmung im Serum 33
3.7. Statistische Angaben zur Qualitätskontrolle ... 34
3.7.1. Richtigkeit 34
3.7.2. Präzision 34
3.8. Aufbewahrung des Antiserums 35
3.9. Messung der Eiweißbindung von Digitoxin im Serum 35
3.1o. Bestimmung von Digitoxin im Urin 37
3.11. Radioimmunoassay für Digoxin 37

Seite

3.12. Dünnschichtchromatographie als Verfahren zum Studium des Metabolismus von ^{3}H-Digitoxin 39
3.12.1. Stabilität und Reinheit von ^{3}H-Digitoxin 39
3.12.2. Quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen 4o
3.12.3. Fließmittelsysteme zur Trennung von Digitoxin- und Digoxinmetaboliten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie . 4o
3.12.4. Extraktionsverfahren zur Reinigung von Metaboliten des Digitoxins im Urin ... 43
3.13. Gaschromatographie (GC-EC) als Verfahren zum Studium des Metabolismus der nichthydrierten und dihydrierten Metaboliten von Digoxin 44
3.14. Nichtinvasive Messung der systolischen Zeitintervalle und der Änderung der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve ... 48
3.15. Statistische Auswertung 49

4. Patienten 5o

5. Ergebnisse 55
5.1. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei gesunden Probanden und Patienten mit Herzinsuffizienz 55
5.1.1. Häufigkeitsverteilung der Serumdigitoxinspiegel in einem unausgewählten und ausgewählten Krankengut 55
5.1.2. Serumdigitoxinspiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz 55
5.1.3. Eiweißbindung von Digitoxin und Konzentration des eiweißungebundenen Digitoxins bei Patienten mit Herzinsuffizienz 56

Seite

5.1.4. Vergleich von Serumdigitoxinspiegel, eiweißungebundenem Digitoxin im Serum und Digitoxinkonzentration im Speichel 56
5.1.5. Absorption von Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei gesunden Probanden 57
5.1.5.1. Absorption von Digitoxin im Magen 57
5.1.5.2. Absorption von Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei zusätzlicher Gabe von kolloidalem Aluminiumhydroxid (Aludrox^{R}) 58
5.1.6. Elimination von Digitoxin bei Probanden.. 58
5.1.7. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei gesunden Probanden im Äquilibrium ... 59
5.1.8. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Probanden im Pseudoäquilibrium 60
5.1.9. Renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit Herzinsuffizienz 61
5.2. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 61
5.2.1. Serumdigitoxinspiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 61
5.2.2. Eiweißbindung von Digitoxin und Konzentration des eiweißungebundenen Digitoxins bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 62
5.2.3. Absorption von Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 63
5.2.4. Elimination von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 64
5.2.5. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Äquilibrium 64

Seite

5.2.6. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Pseudoäquilibrium. 65
5.2.7. Renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 66
5.3. Untersuchungen zum Metabolismus von Digitoxin bei Patienten mit Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz 67
5.3.1. Dichlormethanlösliche (kardioaktive) Metaboliten des Digitoxins im Urin 68
5.3.2. Wasserlösliche, polare (sog. kardioinaktive) Metaboliten des Digitoxins im Urin 68
5.4. Einfluß von Digitoxin auf die mit Hilfe nichtinvasiver Technik gemessenen herzdynamischen Parameter bei gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninusffizienz 69
5.5. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose 72
5.5.1. Serumdigitoxinspiegel und Konzentration des eiweißungebundenen Digitoxins bei Patienten mit Leberzirrhose 72
5.5.2. Eiweißbindung von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose 72
5.5.3. Elimination von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose 73
5.5.4. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose im Pseudoäquilibrium 74
5.5.5. Renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose 75
5.6. Serumdigoxinspiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz . 76

Seite

5.6.1. Dihydrierte Metaboliten des Digoxins bei Patienten mit Herzinsuffizienz 76
5.6.2. Dihydrierte Metaboliten des Digoxins bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 79
5.6.3. Dihydrierte Metaboliten des Digoxins bei Patienten mit Digoxinintoxikation .. 79

6. Diskussion 8o
6.1. Bedeutung von Serumspiegeln und Körpermenge der Digitalisglykoside Digitoxin und Digoxin .. 8o
6.2. Pharmakokinetik von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz 84
6.3. Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose 1o5
6.4. Untersuchungen zum Stoffwechsel von Digoxin ... 1o9

7. Therapie mit Digitalisglykosiden 115

8. Zusammenfassung 125

9. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Nachweismethoden für Digitoxin und Digoxin

Die Herzglykoside Digitoxin und Digoxin werden über die Nieren und Galle unverändert und als Metaboliten ausgeschieden. Die Leber gilt für beide Herzglykoside als Hauptorgan der Metabolisierung (Okita et al. 1955, Repke 1963, Marcus et al. 1966, 1966 a). Krankheiten beider Organe können daher vielfältige Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Digitoxin und Digoxin haben, die für die klinische Anwendung von wesentlicher Bedeutung sind.

Lange Jahre mangelte es an Nachweismethoden für Digitalisglykoside, die empfindlich genug waren, Serumglykosidkonzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten im Nanogrammbereich zu messen. Friedman et al. (195o, 1952, 1952 a) waren die ersten, denen es mit dem Entenembryoassay gelang, erste Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin beim Menschen zu machen. Die untere Nachweisgrenze lag mit 5 ng für das Lanatosid C relativ hoch und die Spezifität war gering (Friedman und Bine 1947).
Es folgte dann in den 6oer Jahren die Aera derIsotopenmethoden. Für Digoxin war sie an die Namen Doherty, Perkins und Markus und für Digitoxin an die Namen Okita, Ashley und Geiling geknüpft. Mit den Radioisotopen konnten grundlegende Daten wie z.B. über den Einfluß der Nierenfunktion auf die Elimination von Digoxin gewonnen werden (Doherty et al. 1964, Bloom und Nelp 1966, Marcus et al. 1966 a).

Einige Ergebnisse, insbesondere solche, die sich auf Untersuchungen mit Radioisotopen geringer spezifischer

Aktivität oder unspezifischer Markierung beziehen, sind mittlerweile revisionsbedürftig. Heute stehen spezifisch markierte Digoxinisotope oder stabile, geninmarkierte Digitoxinisotope zur Verfügung. Die Radioisotopenmethode ist wegen ihrer Empfindlichkeit für Metabolitenstudien und kinetische Studien noch unentbehrlich.
Ende der 6oer Jahre und Anfang der 7oer Jahre wurden dann die ^{86}RbCl-Hemmethode, der Double Isotope Dilution Derivative Assay, der Na^+— K^+— ATP-ase Hemmtest, der Radioimmunoassay, der Enzymatic Isotope Displacement Assay, der Gaschromatographie Assay und der Enzymimmunoassay zum Nachweis von Digoxin und Digitoxin entwickelt (Löwenstein 1965, Löwenstein und Corril 1966, Lukas und Peterson 1966, Burnett und Conklin 1968, Oliver et al. 1968, Smith, Butler und Haber 1969, Jelliffe 197o, Watson und Kalman 1971, Chang, Crowl und Schneider 1975).
Die Empfindlichkeit dieser Methoden ist unterschiedlich. Es lassen sich aber Glykosidkonzentrationen im Nanogramm-bereich ohne Schwierigkeiten messen. Ein großer Vorteil besteht darin, daß pharmakokinetische Studien unter Steady-state Bedingungen durchgeführt werden können. Auch sind sie für die Arzneimittelprüfung der Herzglykoside z.B. Untersuchungen zur biologischen Verfügbarkeit anwendbar. Die Gaschromatographie mit Elektroneneinfang-detektor führte zur Entdeckung der dihydrierten Metaboliten des Digoxins und erlaubte erstmalig systematische Studien zur klinischen Bedeutung dieser Metabolitengruppe (Watson, Clark und Kalman 1973, Clark und Kalman 1974).
Als Vorteil des Radioimmunoassays seien die hohe Meß-empfindlichkeit, die geringen Serummengen, die Reproduzier-barkeit, die Spezifität und der relativ geringe zeitliche, personelle und finanzielle Aufwand erwähnt.

Entgegen früheren Ergebnissen von Okita et al. (1955), die mit biologisch synthetisiertem ^{14}C-Digitoxin von geringer spezifischer Aktivität (Geiling et al. 195o), nur 8% unverändertes Digitoxin im Urin von Patienten fanden, wird nach neueren Untersuchungen Digitoxin zu etwa 6o - 8o% unverändert im Urin ausgeschieden (Storstein 1973, Bodem et al. 1975, Wirth et al. 1976, Peters et al. 1977 a, Vöhringer 1978). Storstein (1973) konnte bei Patienten unter Dauertherapie in der dichlormethanlöslichen Phase sogar 9o% unverändertes Digitoxin im Urin nachweisen. Die 12-ß Hydroxylierung des Digitoxins spielt beim Menschen im Vergleich zur Ratte, bei der 5o - 6o% des Digitoxins in Digoxin und Digoxigeninbisdigitoxosid umgewandelt werden (Repke et al. 1959, Rietbrock und Vöhringer 1974), keine bedeutende Rolle (Lahrtz et al. 1969, Kramer et al. 197o, Beermann et al. 1971, Storstein 1973, Vöhringer und Rietbrock 1974, Peters et al. 1975, 1977 a, Kramer et al. 1977, Rietbrock et al. 1977). Die wasserlöslichen Metaboliten des Digitoxins machen im Plasma und Urin etwa 2o - 3O% aus (Vöhringer und Rietbrock 1974, Peters et al. 1975).

Neuere Untersuchungen von Flasch et al. (1977) zeigten, daß Glykosidglukuronide und -sulfate die gleiche Kreuzreaktion haben wie der Steroidkern. Sie werden entsprechend der Kreuzreaktivität ihres Steroidkerns mehr oder minder stark vom spezifischen Antikörper erfaßt. Diese Fehlermöglichkeit bei der radioimmunologischen Digitalisbestimmung richtet sich nach dem Anteil der Glukuronid- und Sulfatester an der wasserlöslichen Metabolitenfraktion. Für das Digitoxin belief sich der Anteil im Urin auf 2o%, während im Plasma die Höhe des Anteils nicht bekannt ist (Vöhringer und Rietbrock 1974).

Seit der Entdeckung von dihydrierten Metaboliten des Digoxins (Luchi und Gruber 1968, Watson, Clark und Kalman

1973) und Digitoxins (Bodem und v. Unruh 1977, Klehr et al.1977), die als kardioinaktiv gelten (Repke 1961, Bach und Reiter 1964, Lage und Spratt 1966, Okarma, Tramell und Kalman 1972), bestehen zusätzliche Probleme in Bezug auf den Radioimmunoassay. Durch Verwendung von spezifischen Antikörpern, die nur eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber den dihydrierten Metaboliten haben, läßt sich aber die Aussagefähigkeit des radioimmunologisch gemessenen Digitalisspiegels erhöhen.
Daneben gibt es eine Reihe von Faktoren, die mehr oder weniger die radioimmunologische Messung beeinflussen können. Diese sind: hohe Konzentrationen an Bilirubin (eigene Ergebnisse), Hämolyse, Alter der Serumprobe und des markierten Radioisotops (Cerceo und Elloso 1972), Anwesenheit von Radioisotopen, Eigenfluoreszenz des Serums von Patienten mit Urämie (Butler 1972) und Albuminkonzentration der Serumprobe (Holtzman et al. 1974, Shaw 1975, Voshall et al. 1975).
Die Kenntnis und Berücksichtigung dieser Faktoren bei der radioimmunologischen Bestimmung von Herzglykosiden hat die Genauigkeit der Messung wesentlich verbessert. Dies ist auch die Ursache dafür, daß sich bisher keine der sonstigen Bestimmungsmethoden gegenüber dem Radioimmunoassay durchgesetzt hat.

1.2. Chemische Struktur und Kardioaktivität von Digitoxin, Digoxin und seinen Metaboliten

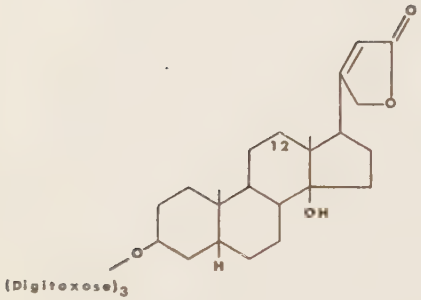
In der Natur gibt es eine unüberschaubar große Anzahl an Herzglykosiden. Sie sind nur teilweise in ihrer Struktur aufgeklärt. Trotz großer Anstrengungen und Fortschritte bei der Aufklärung der Struktur von Herzglykosiden bleiben im biologischen Bereich hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Wirksamkeit und Struktur noch viele Fragen offen

(Tamm 1963). Dies betrifft u.a. besonders die weitgehend noch ungelösten Probleme der Stereoisomere, wobei es darum geht, welche sterische Konfiguration (α, ß Form) eines Glykosids kardiale Wirksamkeit entfaltet. Hier sollen nur die beiden Herzglykoside Digitoxin und Digoxin bzw. die Derivate ß-Methyldigoxin und ß-Acetyldigoxin erwähnt werden. Digoxin unterscheidet sich vom Digitoxin nur durch eine Hydroxylgruppe in 12 ß Stellung (Abb. 1). Beide gehören zur Gruppe der Cardenolide und haben als Strukturkern einen Steroidalkohol oder das sogenannte Genin. Das Genin besteht aus dem Cyclopentanoperhydrophenanthrenmolekül. Die Ringverknüpfung des A, B, C und D Ringes ist cis, trans, cis. Im Unterschied dazu sind die Hormone der Androstan- und Pregnan-Reihe cis, trans, trans verknüpft. In Position C 17 findet sich ein α, ß ungesättigter Laktonring. Digoxigenin und Digitoxigenin haben in 3 ß und 14 ß Stellung eine Hydroxylgruppe. Die Genine sind esterartig ß-glykosidisch in Position C 3 mit ein bis drei Molekülen d-Digitoxose verbunden. Digitoxin und Digoxin sind Glykoside mit drei Molekülen d-Digitoxose.

Bruttoformel für Digitoxin: $C_{41}\ H_{64}\ O_{13}$, MW = 764,9
Bruttoformel für Digoxin : $C_{41}\ H_{65}\ O_{14}$, MW = 780,9

ß-Acetyldigoxin und ß-Methyldigoxin sind halbsynthetische Derivate, die durch Acetylierung bzw. Methylierung der endständigen Digitoxose des Digoxins hergestellt werden.
Die Kardioaktivität wird durch das Genin bestimmt. Der Vergleich mit den kardial unwirksamen Steroidhormonen (Repke 1963) zeigt, daß die Ringverknüpfung für die Kardioaktivität wichtig ist. 17α-Cardenolide sind im Gegensatz zu den Steroisomeren 17 ß-Cardenoliden unwirksam. Ebenfalls führt die Epimerisierung von 3 ß-OH-Genin zu 3α -OH-Genin zu einem vollständigen Wirkungsverlust.

DIGITOXIN



DIGOXIN

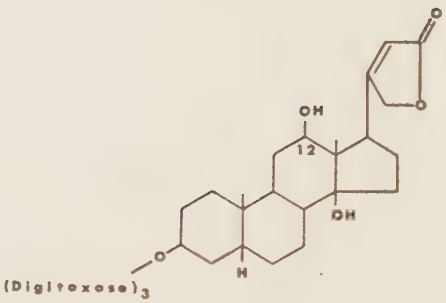
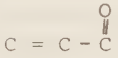


Abb. 1: Strukturen von Digitoxin und Digoxin

Die Sättigung der 2o = 22 Doppelbindung im Laktonring des Digoxins führt zu Metaboliten, die nur 1/7 - 1/22 der Kardioaktivität von ungesättigten Metaboliten aufweisen (Chen und Henderson 1954, Vick et al. 1957, Bach und Reiter 1964, Lage und Spratt 1966, Okarma, Tramell und Kalman 1972).

In in-vitro Versuchen mit dem ATP ase-Enzymtest von Erythrocytenmembranen fand Repke (1963), daß Digitoxin 11 mal stärker die Membran-ATP ase hemmt als Dihydrodigitoxin. Der Vergleich mit Cassain zeigt ferner, daß nicht so sehr der Laktonring, sondern die Gruppierung der Carbonylgruppe in Konjugation mit der 2O = 22 Doppelbindung



für die inhibierende Wirkung auf die Membran-ATP ase entscheidend ist (Repke und Portius 1965). Weitere Änderungen der Wirksamkeit sind durch Einführung von Hydroxylgruppen im Steroidkern möglich. Ein Fehlen der Hydroxylgruppe in C 14 Position geht mit Verlust an Kardioaktivität einher (Chen und Henderson 1954).
Die Zuckermoleküle haben nur geringen Einfluß auf die Kardioaktivität. Sie verändern aber entscheidend die physikochemischen Eigenschaften des Steroidmoleküls, insbesondere seine Polarität. Nach Chen und Henderson (1954) ist die Reihenfolge der Kardioaktivität für Cardenolide: Triglykosid < Bisglykosid < Monoglykosid > Genin.

Neben der Steroidstruktur ist letztlich für die biologische Wirkung beim Menschen entscheidend, welches pharmakokinetische Verhalten das Herzglykosid im Körper aufweist.

2. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe spezifischer Nachweismethoden, wie dem Radioimmunoassay, der Gaschromatographie, der Radioisotopentechnik und der Dünnschichtchromatographie, Kinetik und Stoffwechsel von Digitoxin und Digoxin bei verschiedenen Patientengruppen zu untersuchen. Aus den Untersuchungsergebnissen werden Hinweise für die Therapie abgeleitet.

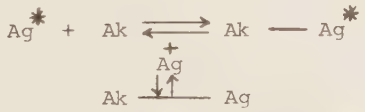
Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Digitoxinkonzentration im Serum bei verschiedenen Patientengruppen.
2. Einfluß der chronischen Niereninsuffizienz auf die Pharmakokinetik von Digitoxin.
3. Einfluß der Leberzirrhose auf die Pharmakokinetik von Digitoxin.
4. Digoxinkonzentration im Serum bei verschiedenen Patientengruppen.
5. Metabolismus von Digoxin unter besonderer Berücksichtigung der Reduktion.

3. Methodik

3.1. Prinzip des Radioimmunoassays

Der erste Radioimmunoassay geht auf die Entdeckung von Insulinantikörpern im Blut von Patienten mit Diabetes mellitus durch Berson und Yalow im Jahre 1956 zurück. Die Antikörper ließen sich elektrophoretisch der γ-Globulinklasse zuordnen. Sie fanden unter anderem als Hinweis für spezifische Insulinantikörper, daß radioaktiv markiertes ^{131}Jod-Insulin durch unmarkiertes Insulin aus der Bindung an den Antikörper verdrängt wurde. Hiermit war das Grundprinzip des Radioimmunoassays erkannt. Es beruht auf einer kompetitiven Wechselwirkung von zwei gleichartigen Antigenen um einen Antikörper, von denen eines radiomarkiert ist.



Die Geschwindigkeit der Bildung des Antigen-Antikörperkomplexes wird durch die Affinität des Antigens zum Antikörper bestimmt. Gleichzeitig mit der Assoziation des Antigen-Antikörperkomplexes findet die Dissoziation statt. Die Einstellung des Gleichgewichtszustandes wird durch Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt. Wenn der Assay in praxi durchgeführt wird, werden radioaktiv markiertes Antigen und Antikörper mit der Probe, die unmarkiertes Antigen enthält, inkubiert. Nach Einstellung des Gleichgewichtszustandes werden freies Antigen und Antigen-Antikörperkomplex getrennt. Beim Radioimmunoassay für Herzglykoside hat sich für die Trennung Dextran-

beschichtete Holzkohle bewährt. Auch die "Doppelantikörpermethode" wird häufig angewandt, indem der Antigen-Antikörperkomplex durch einen zweiten Antikörper (Schaf und Ziege), der gegen den Kaninchenantikörper gerichtet ist, präzipitiert wird (Oliver et al. 1968).

Die Antigenkonzentration der Probe läßt sich durch Vergleich der Hemmung der Bindung des radioaktiv markierten Antigen-Antikörperkomplexes mit der von Standardlösungen errechnen. Hierbei werden bekannte Mengen an unmarkiertem Antigen in den Ansatz mit einer bekannten Menge an markiertem Antigen und Antikörper gegeben.
Der erste brauchbare Radioimmunoassay für Digitalisglykoside wurde für das Digitoxin durch Oliver et al. (1968) eingeführt. Zur Herstellung der Antikörper verwandten sie als Antigen den 3-O-Succinyl-digitoxigenintyrosinmethylester, der an Albumin gekoppelt wurde.
1967 hatten bereits Butler und Chen ein komplettes Antigen hergestellt, indem sie Digoxin an Albumin koppelten.
Aber erst 1969 wurden von Smith, Butler und Haber ein ausreichend empfindlicher Radioimmunoassay für Digoxin beschrieben, der Antikörper verwandte, die nach der Methode von Butler und Chen (1967) hergestellt waren.

Die Bindung des spezifischen Antigens mit den Haftstellen des Antikörpers wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben.

$$K = \frac{[Ag \times Ak]}{[Ag] \times [Ak]}$$

Für die Assoziationskonstante K wird auch der Begriff Avidität benutzt. Diese kennzeichnet die Bindungsenergie des Antikörpers gegenüber dem Antigen. Heterogene Antikörpergemische werden verschiedene Aviditäten besitzen

und die experimentell erhaltene Zahl K (Liter/mol) stellt einen Mittelwert aus verschiedenen Werten für K dar. Bei Gemischen von Antikörpern ist sie kleiner als bei spezifischen Antikörpern einer einzelnen Population (Zettner 1973).

3.2. Herstellung eines Antiserums gegen Digitoxin

(Butler und Chen 1967, Smith, Butler und Haber 197o, Verspohl 1973)

3.2.1. Substanzen und Reagenzien

Digitoxin wurde in kristalliner Form von der Fa. Boehringer (Mannheim) geliefert.
Die Reinheit wurde in alkoholischer Lösung dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-GF-Platten in zwei Fließmittelsystemen überprüft.
Fließmittel:

1. Aethylmethylketon/Xylol 5o : 5O. Kieselgelplatten GF_{254} mit 12% Formamid/Aceton imprägniert (Methode nach Storstein 1973, 1976).
2. Aethylacetat/Chloroform/Eisessig 9o : 5 : 5 (Methode nach Figueiro und Carvalhas 1973).
   Die Digitoxinsubstanz erscheint im sichtbaren Licht nach Erhitzen (1oo ^{o}C, 1o Min.) und Ansprühen mit 5o% H_2SO_4/Methanol-Lösung und unter UV - Licht als ein isolierter scharfer Fleck. Der R_F-Wert entsprach dem cochromatographierten ^{3}H-Digitoxin. Das Digitoxin war somit dünnschichtchromatographisch rein.
   ^{3}H-Digitoxin, Lot Nr. 772-26o, spez. Aktivität = 14,3 mCi/mg (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.). Die radiochemische Reinheit des ^{3}H-Digitoxins betrug in den angegebenen Fließmittelsystemen 97,3 und 99,o% (Peters et al. 1978).

Fließmittel:
Aethylmethylketon, Xylol, Aethylacetat, Aceton, Chloroform, Eisessig, Formamid p.a. (Merck, Darmstadt).

Substanzen, die zur Synthese des Digitoxin-Proteinkonjugats verwandt wurden:

1. Digitoxin reinst (Boehringer, Mannheim, Art 9o1o4)
2. Äthylenglycol p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 9621)
3. Äthanol abs. p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 972)
4. Kaliumcarbonat p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 4928)
5. Ameisensäure p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 264)
6. Salzsäure p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 9o57)
7. Natriummetaperjodat p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 6597)
8. Natriumhydrogencarbonat p.a. (Merck, Darmstadt, Art. 6329)
9. Natriumborhydrid z. Synthese (Merck, Darmstadt, Art. 8o6373)
1o. Serum-Albumin vom Rind, reinst (Behringwerke, Marburg, Art. 5oo9 A)
11. Gammaglobulin vom Rind, trocken, reinst, (Behringwerke, Marburg, Art. 4859)

Komplettes Freund'sches Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA).

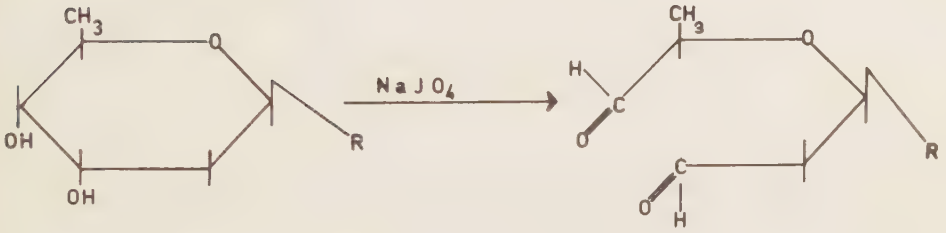
3.2.2. Kopplung von Digitoxin an Rinderalbumin

Herstellung des Digitoxinalbuminkonjugats
(Methode nach Lieberman, Erlanger und Beiser 1959)

a) Oxydation der endständigen Digitoxose

436 mg Digitoxin (= o,57 mmol) werden in 2o ml abs. Aethylalkohol gelöst.
Unter Rühren (Magnetrührer) werden tropfenweise 2o ml O,1 M Natriumperjodat ($NaJO_4$) zugegeben, 25 Minuten

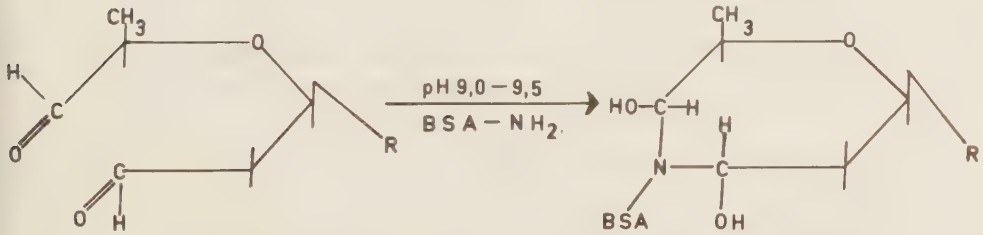
danach erfolgt die Zugabe von 0,6 ml 1 M Aethylenglycol (Reaktionsgemisch 1).



R = Digitoxigeninbisdigitoxosid

b) Kopplung von Rinderalbumin an Digitoxin

560 mg Rinderalbumin werden in 20 ml H_2O aufgelöst und das pH mit ungefähr 0,5 ml 5% K_2CO_3-Lösung auf 9,5 eingestellt. Zu dieser Albuminlösung wird das frisch zubereitete Reaktionsgemisch 1 tropfenweise unter Rühren hinzugegeben. Das pH wird durch Zugabe von etwa 2 ml 5% K_2CO_3-Lösung über 45 Minuten zwischen 9,0 und 9,5 gehalten (Reaktionsgemisch 2).

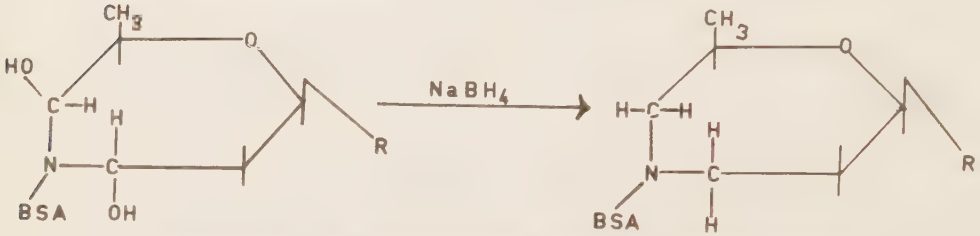


c) Reduktion des Digitoxinkonjugatkomplexes

Die Reduktion der endständigen hydroxylierten Digitoxose erfolgt mit frisch zubereiteter 1,5% Natriumborhydrid-Lösung (ungefähr 20 ml).

Nach 3 Stunden wird das pH mit 7,5 ml 1 M Ameisen-

säure zunächst für 1 Stunde auf 6,5 gesenkt, anschließend mit 1 M NH_4 OH auf pH 8,5 angehoben (Reaktionsgemisch 3).



d) Reinigung des Rinderserumalbumin-Digitoxinkonjugats (Gleichgewichtsdialyse-Präzipitation)

Das Reaktionsgemisch 3 wird in einen Cellulose-Dialysierschlauch gefüllt. Die Porengröße läßt Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 12.000 frei diffundieren (Fa. Arthur H. Thomas & Co., Philadelphia, USA). Dialysiert wird 12 Stunden lang gegen fließendes Wasser. Durch Senkung des pHs auf 4,5 mit 0,1 N HCl und Aufbewahren des Proteinkomplexes 1 Std. bei 22 °C und 4 Stunden bei 4 °C kommt es zur inkompletten Präzipitation. Anschließend wird die Suspension 1 Std. bei 1ooo g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wird in 5 ml 0,15 M Na HCO_3 gelöst und dann erneut 4 Tage lang gegen Wasser von 22 °C dialysiert.

Durch Lyophilisierung war das Rinderserumalbumin-Digitoxinkonjugat für mindestens 9 Monate stabil.

3.2.3. Immunisierung von Kaninchen

Immuniserungsvorgang

Die Immunisierung mit Rinderserumalbumin-Digitoxinkonjugat wurde bei 3 männlichen Kaninchen der gleichen Spezies (weiße Neuseeland Kaninchen, Gewicht 3 kg) nach dem

Schema von Smith, Butler und Haber (197o) vorgenommen. Jedes Kaninchen erhielt in den ersten drei Monaten wöchentlich 2 mg Antigen (Rinderserumalbumin-Digitoxinkonjugat), danach alle 14 Tage 1 - 2 mg. Das lyophilisierte Antigen (für 3 Tiere = 6 mg) wurde in 3 ml 0,85% Na Cl-Lösung gelöst und mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schen Adjuvans versetzt. Die vollständige Mischung der Wasser in Öl Emulsion wird durch tropfenweise Zugabe von Freund'schem Adjuvans und Mischung mit Hilfe einer Glasspritze nach 1 Stunde erreicht. Jedes Tier bekommt 1,5 - 2,o ml der Emulsion an 4 - 6 Stellen subkutan auf dem Rücken zu beiden Seiten der Wirbelsäule injiziert.
Das komplette Freund'sche Adjuvans (getötete Tuberkelbakterien in öliger Flüssigkeit) hat den Sinn, eine lokale Entzündung zu verursachen, dadurch die Absorption von Antigen zu verlangsamen und die Immunabwehr zu stimulieren (Hurn und Landon 1973).

Bei allen 3 Kaninchen entwickelten sich mehr oder weniger ausgeprägte Granulome.Die Granulombildung ging ohne Krankheitserscheinungen einher. Sie zeigte keine Beziehung zum Antikörpertiter. Das Kaninchen mit dem höchsten Digitoxinantikörpertiter hatte am geringsten Granulome entwickelt.
Die Blutentnahmen bei den Kaninchen erfolgten nach 4 1/2, 6 1/2, 8 bzw. 9 Monaten aus einer der Ohrvenen.

3.3. Voruntersuchungen zur Aufstellung eines Radioimmunoassays für Digitoxin

Mit dem Digitoxinassay sollen Serumspiegel zwischen 1,o und 4o,o ng/ml mit genügender Genauigkeit und in möglichst kleinen Serummengen gemessen werden. In diesem Bereich lagen in unserem Krankengut 9o% der Digitoxinspiegel (s. Kapitel 5.1.1.).
Bei speziellen Untersuchungen, wie der Bestimmung der freien Digitoxinkonzentration im Serum oder der Digitoxinkonzentration im Liquor kann es sogar notwendig werden, Digitoxinspiegel in einem Bereich zwischen o,3 - 1,o ng/ml nachzuweisen (s. Kapitel 3.9.).

3.3.1. Nachweis von Digitoxin-Antikörpern

Der Antikörpertiter wurde durch Antiserumverdünnung und Messung der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung bei Einsatz von O,536 pmol oder O,41 ng ^{3}H-Digitoxin in den Assay bestimmt. Die Angaben über den Antikörpertiterverlauf beziehen sich auf die Antiserumverdünnung, bei der 5o% des zugesetzten ^{3}H-Digitoxins gebunden wird (Reaktionsansatz s. Kapitel 3.3.3.).

Die immunologische Antwort war bei allen 3 Kaninchen unterschiedlich (Abb. 2).
Unter den genannten Bedingungen betrug der maximale Antikörpertiter bei dem ersten Kaninchen (5oo7/75) nach 6 1/2 Monaten und 18 Boosterinjektionen 1 : 1o ooo. Dies entspricht einer Endverdünnung von 1 : 9o ooo, da bei Einsatz in den Reaktionsansatz eine weitere neunfache Verdünnung des Antiserums erfolgt.

Bei dem zweiten Kaninchen (5oo8/75) betrug der maximale

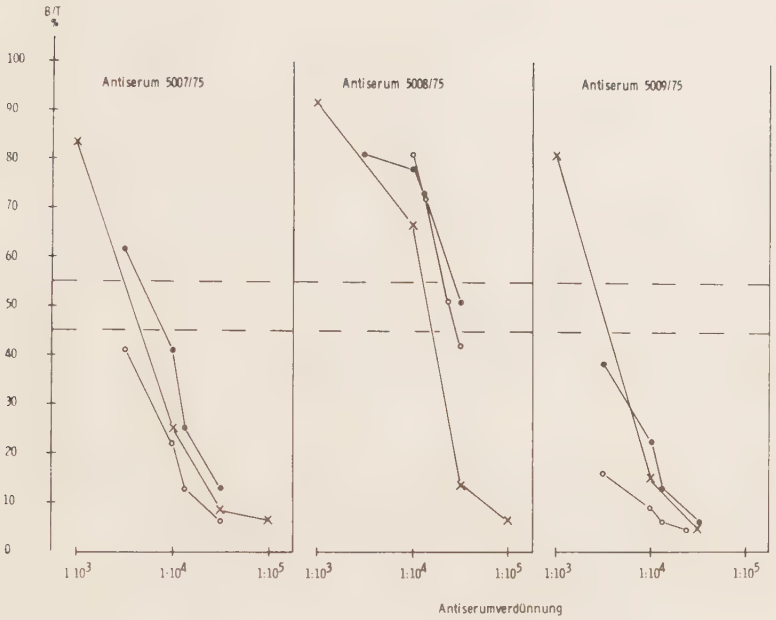


Abb. 2: Verlauf des Antikörpertiters bei Kaninchen nach wöchentlicher subkutaner Injektion von 2 mg Digitoxin-Rinderalbuminkomplex.
B/T = Bindung von ^{3}H-Digitoxin (0,536 pmol/Ansatz) in Prozent der Totalradioaktivität.
AS-Verdünnung entspricht der Verdünnung des Antiserums vor Einsatz in den Reaktionsansatz.
x——x nach 4,5 Monaten und 14 maliger Boosterung
o——o nach 6,5 Monaten und 18 maliger Boosterung
●——● nach 8 Monaten und 2o maliger Boosterung (5008) bzw. 9 Monaten und 23 maliger Boosterung (5007/75, 5009/75).

Abszisse: logarithmischer Maßstab
Ordinate: numerischer Maßstab

Antikörpertiter nach 8 Monaten und 2o-maliger Boosterinjektion 1 : 5o ooo bzw. im Reaktionsansatz 1 : 45o ooo.

Beim dritten Kaninchen (5oo9/75) lag der maximale Antikörpertiter bei den vorgegebenen Bedingungen nach 4 1/2 Monaten und 14-maliger Boosterinjektion zwischen 1 : 1 ooo bzw. 1 : 9 ooo und 1 : 1o ooo bzw. 1 : 9o ooo. Trotz weiterer Boosterungen (22 mal über 9 Monate) konnte der Antikörpertiter nicht gesteigert werden.

Vom zweiten Kaninchen (5oo8/75) wurde durch Ventrikelpunktion 9o ml Blut entnommen und hieraus 48 ml Antiserum gewonnen.
Der Nachweis eines spezifischen Antiserums für Digitoxin wurde dadurch erbracht, daß unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen sich markiertes durch unmarkiertes Digitoxin konzentrationsabhängig aus der Antikörperbindung verdrängen ließ (Abb. 3, 5).

Für den Digitoxin-Radioimmunoassay wurden die Bedingungen so gewählt, daß Empfindlichkeit und Steilheit der Standardeichkurve in dem vorgegebenen Meßbereich optimalen Bedingungen entsprach. Dazu wurde eine Antiserumverdünnung von 1 : 3o ooo und eine ^{3}H-Digitoxinmenge von 0,654 pmol bzw. 0,5 ng/Ansatz gewählt.

Der Vergleich mit zwei käuflichen RIA-Kits (Fa. Sorin, Isotopen-Dienst West), die zur Messung von Digitoxin Digoxin-Antikörper enthielten, zeigt, daß in dem Meßbereich von 0,625 - 2o,o ng/ml die Steilheit der Eichkurve des von uns aufgestellten Digitoxin-Radioimmunoassays um das 2,4- bzw. 3,6 fache größer ist (Abb. 4).

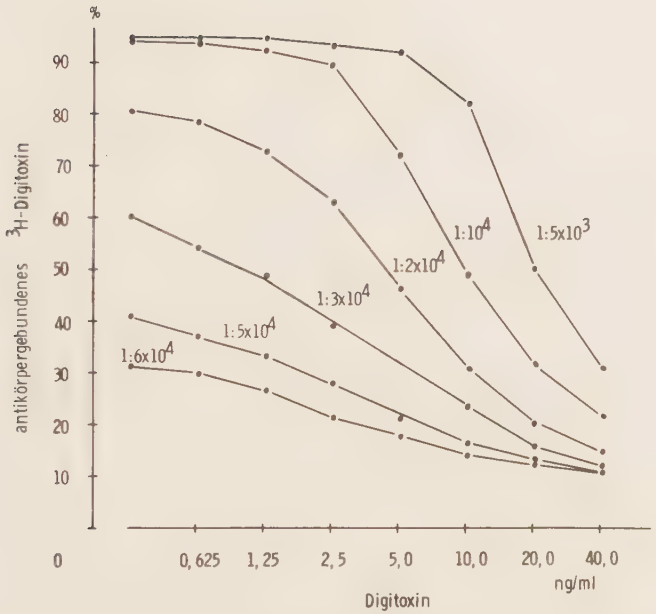


Abb. 3: Änderung der Empfindlichkeit des Digitoxinassays in Abhängigkeit von der Antiserumverdünnung bei gleichbleibender Menge von ^{3}H-Digitoxin (0,654 pmol/Ansatz).
Antikörperverdünnung entspricht der Verdünnung des Antiserums vor Einsatz in den Reaktionsansatz.

Abszisse: logarithmischer Maßstab
Ordinate: numerischer Maßstab

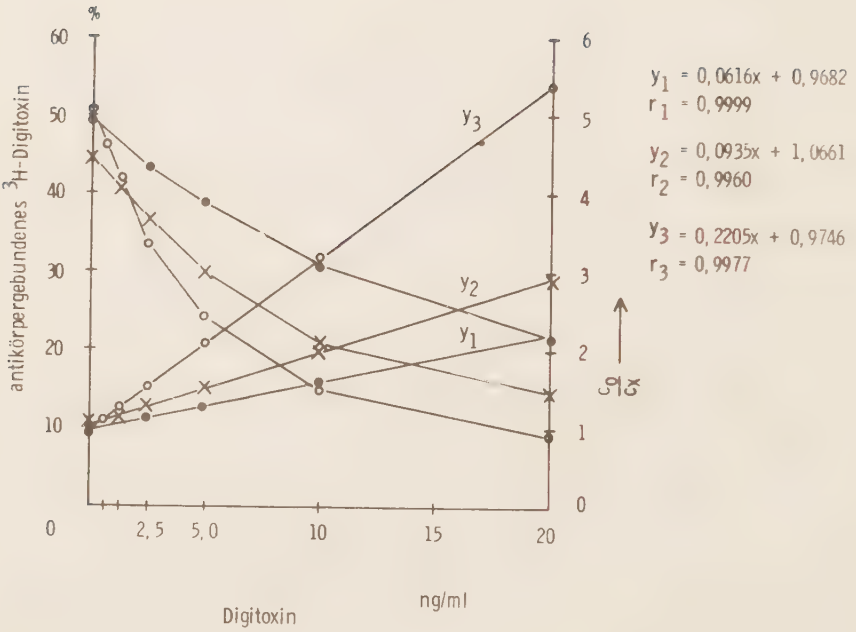


Abb. 4: Eichkurvenverlauf bei Verwendung von verschiedenen Antiseren zur Bestimmung von Digitoxin im Serum. ^{3}H-Digitoxinmenge = 0,536 pmol/Ansatz.

●——● bzw. x——x käufliches Digoxin-Antiserum unterschiedlicher Charge.
AS-Endverdünnung = $1 : 10^5$.

o——o Digitoxin-Antiserum. AS-Endverdünnung = $1 : 27 \times 10^4$.

c_o = antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin in Abwesenheit von unmarkiertem Digitoxin.

c_x = antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an unmarkiertem Digitoxin.

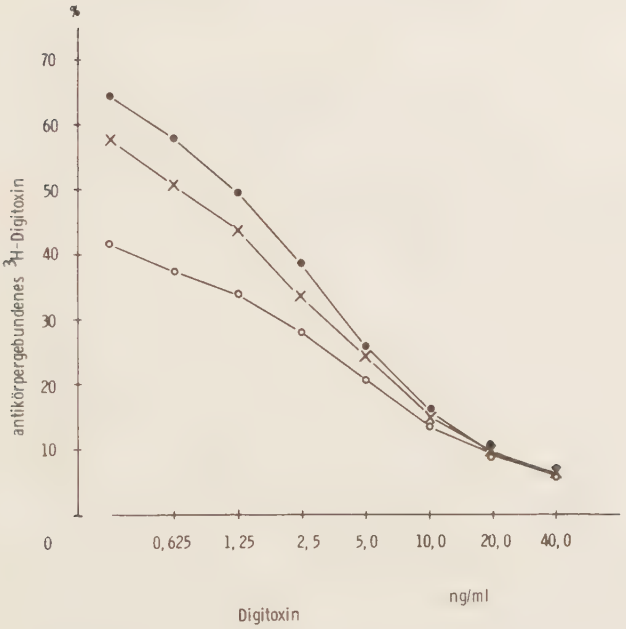


Abb. 5: Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Digitoxinassays von verschiedenen Mengen an ^{3}H-Digitoxin (o——o 0,92 pmol/Ansatz, x——x 0,654 pmol/Ansatz, ●——● 0,458 pmol/Ansatz).
Antiserumverdünnung: 1 : 3 x $1o^4$,
AS-Endverdünnung: 1 : 27 x $1o^4$

Abszisse: logarithmischer Maßstab
Ordinate: numerischer Maßstab

3.3.2. Prüfung der Spezifität des Digitoxin-Antikörpers

Antiseren enthalten meist ein Gemisch von verschiedenen Antikörpern gegen dasselbe Antigen. Die Spezifität eines Antiserums hängt von der Einheitlichkeit der Antikörperpopulation gegenüber den Determinanten des Antigens ab. Gemische von verschiedenen Antikörperpopulationen zeigen mehr oder weniger Kreuzreaktionen (Zettner 1973, Hurn und Landon 1973).

Der Vergleich der relativen Avidität von den zwei verschiedenen Antikörpern, die zur Bestimmung von Digitoxin verwandt wurden, zeigt, daß beide Steroidspezifität besitzen (Tab. 1, 2). Beim Digoxin-Antikörper werden, um den gleichen Hemmeffekt auf die Antikörperbindung an ^{3}H-Digitoxin zu erreichen, 2 mal höhere Mengen (pmol) an Digitoxin als an Digoxin notwendig, während beim Digitoxin-Antikörper 2 mal höhere Digoxinmengen als Digitoxin gebraucht werden. Mono-, Bis- und Trisglykoside zeigen nur geringfügige Differenzen in der Immunreaktivität beim Digoxin- und Digitoxin-Antikörper, während die Genine einen geringfügigen Verlust an relativer Bindungsaffinität aufweisen. Die Geninspezifität verhält sich beim Digoxin-Antikörper in Bezug auf Digoxigenin und Digitoxigenin wie 3,6 : 1 und beim Digitoxin-Antikörper wie 1 : 7. Das sterische Äquivalent zum Digitoxigenin 3 epi Digitoxigenin kann vom Digitoxin-Antikörper nicht vom Digitoxigenin unterschieden werden. Die Hemmung der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung (0,54 pmol ^{3}H-Digitoxin) um 5o% ($\frac{max}{2}$) wird beim Digoxin-Antikörper (AS-Endverdünnung = 1 : 1oo ooo) durch 1,2 pmol Digoxin und 2,o pmol Digitoxin erreicht, dagegen bei Verwendung des Digitoxin-Antikörpers (AS-Endverdünnung =

Relative Bindungsaffinität des Digitoxin-Antikörpers

Substanz	Molekular-gewicht	pmol Substanz[+]	Rel. Bindungs-affinität (%)[++]
DT 3	764,9	0,61	100
H_2-DT 3	766,9	26,5	2,3
DT 2	634,8	0,68	91
DT 1	504,6	0,81	75
DT 0	374,5	0,98	62
epi DT 0	374,5	0,99	62
DG 3	780,9	1,40	43
DG 2	650,8	1,41	43
DG 1	520,6	1,49	41
DG 0	390,5	6,91	9
Testosteron	288,4	4500	0,01
Progesteron	314,5	3950	0,015

Keine signifikante Kreuzreaktivität gegenüber Prednisolon, Canrenoat-Kalium, Cholesterin, Oestrogen, Aldosteron, Rifampicin in mehr als 10^4fachem molarem Überschuß.

[+]pmol Substanz zur 50% Hemmung der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung (0,536 pmol = 0,41 ng ^{3}H-Digitoxin/Ansatz).

[++]Relative Bindungsaffinität (%) entspricht dem Quotienten aus der Menge an unmarkiertem Digitoxin zu der Menge der zu prüfenden Substanz, die erforderlich sind, um 50% ($\frac{max}{2}$) des radioaktiv markierten Digitoxins aus der Antikörperbindung zu verdrängen.

Tab. 1

Relative Bindungsaffinität des Digoxin-Antikörpers

Substanz	Molekular-gewicht	pmol Substanz[+]	Rel. Bindungs-affinität (%) [++]
DT 3	764, 9	1, 99	100
DT 2	634, 8	1, 81	110
DT 1	504, 6	1, 90	105
DT 0	374, 5	6, 28	31
DG 3	780, 9	1, 17	170
DG 2	650, 8	1, 17	170
DG 1	520, 6	1, 08	108
DG 0	390, 5	1, 74	67

+ pmol Substanz zur 50 % Hemmung der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung (0, 536 pmol = 0, 41 ng ^{3}H-Digitoxin/Ansatz)

++ Relative Bindungsaffinität (%) entspricht dem Quotienten aus der Menge an unmarkiertem Digitoxin zu der Menge der zu prüfenden Substanz, die erforderlich sind, um 50 % ($\frac{max}{2}$) des radioaktiv markierten Digitoxins aus der Antikörperbindung zu verdrängen.

Tab. 2

= 1 : 27o ooo) durch 1,38 pmol Digoxin und 0,61 pmol Digitoxin.
Nach Angaben des Herstellers und eigenen Untersuchungen bestand beim Digoxin-Antikörper keine bedeutsame Immunreaktivität für Cholesterin, Cortisol, Testosteron, Aldosteron und Canrenon, während sie für Dihydrodigitoxin 1o% betrug (Peters et al. 1974).
Der von uns hergestellte Digitoxin-Antikörper zeigte lediglich beim Testosteron und Progesteron in mehr als 1ooofach molarem Überschuß eine signifikante Kreuzreaktion. Steroidmoleküle wie Cholesterin, Aldosteron, Östradiol, Canrenoat-Kalium, Prednisolon und auch Rifampicin ergaben in-vitro keine Kreuzreaktion in mehr als 1oooofach molarem Überschuß. Die Kreuzreaktivität gegenüber Dihydrodigitoxin betrug 2,3%.

Zusätzliche in-vivo Untersuchungen nach intravenöser Gabe von 2oo mg Canrenoat-Kalium (Aldactone^{R}) erbrachten bei 6 Patienten, die eine Dauertherapie mit O,1 mg/d Digitoxin erhielten, keine Beeinflussung des Digitoxinspiegels im Serum (Abb. 6). Bei 5 weiteren Patienten, die Spironolacton aber kein Digitoxin in einer täglichen Dosierung von 5o - 2oo mg erhielten, lagen alle Werte unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze für den Digitoxinassay. Ähnliche Ergebnisse wurden bei 1o Studentinnen ermittelt, die als Antikonzeptivum eine Östrogen und Progesteron enthaltene Medikation (Lyndiol^{R}: Lynestrenol 2,5 mg + Äthinylöstradiol O,O5 mg) einnahmen.

Zusammengefaßt zeigt der Digitoxin-Antikörper eine gute Unterscheidungsfähigkeit gegenüber Steroidmolekülen mit mehreren Doppelbindungen im A-Ring wie Östradiol oder zusätzlichen Hydroxyl- und Methylgruppen, wie bei Aldosteron, Canrenon, Spironolacton und Prednisolon oder auch Substanzen mit gesättigter $\Delta^{22:2o}$ Doppelbindung im Lakton-

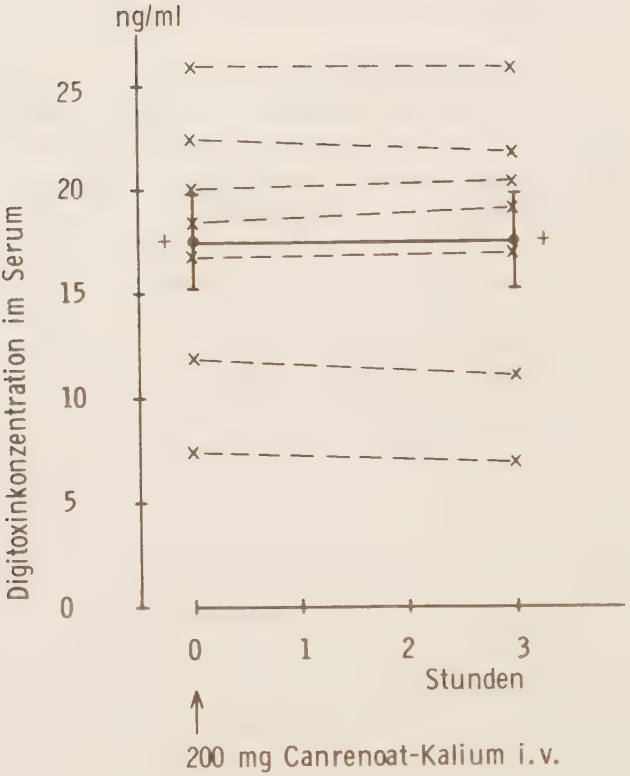


Abb. 6: Änderung der Serumdigitoxinkonzentration (ng/ml) nach intravenöser Applikation von 2oo mg Canrenoat-Kalium (Aldactone^{R}) bei Patienten (n = 7) unter einer peroralen Dauertherapie mit O,1 mg Digitoxin/d. Letzte Digitoxineinnahme 24 Stunden vor Versuchsbeginn.

+ Mittelwert und Standardirrtum des Mittelwertes (SEM)

ring wie z.B. Dihydrodigitoxin.
Es besteht demnach eine Steroidspezifität. Dies mag daran liegen, daß sich der Steroidkern frei am äußersten Ende des Antigens (Glykosid-Proteinkonjugat) befindet. Wie die Bindungen aussehen, die Steroidmoleküle mit den Antikörperhaftstellen eingehen, ist unklar. Eine Anzahl von physikochemischen Kräften können wirken, wie z.B. Ionenkräfte bei geladenen Gruppen, die für die erste Annäherung von Antikörper und Antigen verantwortlich sein sollen. Dann aber auch Bindungen durch Wasserstoffbrücken oder van der Waal'sche Kräfte. Da Bindungsenergie und Spezifität von Antigen-Antikörperreaktionen außerordentlich hoch sind, muß es sich um eine enge physikochemische Bindung handeln (Hurn und Landon 1973).

3.3.3. Bestimmung der Bindungskapazität des Digitoxin-Antiserums

Zur Bestimmung der Bindungskapazität des Digitoxin-Antiserums wurde die Sättigungsmethode, wie sie von Herbert et al. (1965) für Insulinantiseren beschrieben wurde, angewandt. Gemessen wird die maximale Menge (Mol) an ^{3}H-Digitoxin, die von 1 ml unverdünntem Antiserum gebunden wird.
Dazu wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

700 µl = 0,5% Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer 0,01 M, pH = 7,4) in 150 m M Na Cl

100 µl = ^{3}H-Digitoxin (0,23 - 1,38 pmol ≙ 2,52 - 13,9 n Ci) in 0,5% Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer

100 µl = Digitoxin-Antikörper (Endverdünnung im Ansatz von 1 : 2,7 x 10^{5})

500 µl = Dextran-beschichtete Holzkohle (11 mg/ml) in 0,5% Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer

Totalvolumen = 1,4 ml
Reaktionsansatz = O,9 ml
Inkubationszeit = 1 Stunde
Temperatur während der Inkubation und der Trennung von gebundenem und freiem ^{3}H-Digitoxin mit Dextran-beschichteter Holzkohle = 4 ^{o}C.
Trennzeit mit Dextran-beschichteter Holzkohle = 15 Minuten.
Einzelheiten des Vorgehens s. Kapitel 3.4.3.
Aus Abb. 7 geht hervor, daß mit ansteigenden ^{3}H-Digitoxinmengen zunächst eine lineare Beziehung zwischen zugesetzter ^{3}H-Digitoxinmenge und antikörpergebundenem ^{3}H-Digitoxin besteht, dann aber eine Sättigung eintritt. Die maximale Bindungskapazität von O,1 ml Antiserum (Endverdünnung im Ansatz = 1 : 27o ooo) liegt bei O,39 pmol ^{3}H-Digitoxin. Somit wird von 1 ml unverdünntem Antiserum 1o53,o nmol ^{3}H-Digitoxin gebunden.

3.3.4. Bestimmung der Äquilibriumskonstante des Digitoxin-Antikörperkomplexes

Die Äquilibriumskonstante ist nach dem Massenwirkungsgesetz der Quotient aus Assoziations- und Dissoziationskonstante

$$K = \frac{k_1}{k_2}$$

$$[Ak] + [Ag] \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [Ak\ Ag]$$

Verschiedene Autoren (Odell et al. 1969, Zettner 1973, Zettner und Duly 1974, Smith und Skubitz 1975) konnten zeigen, daß sich die Äquilibriums- bzw. Aviditätskonstante

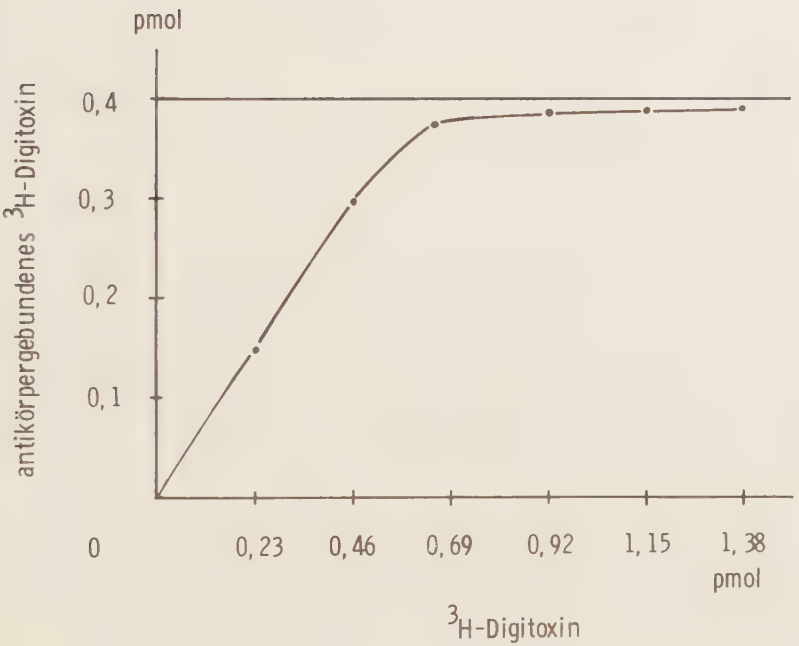


Abb. 7: Bindungskapazität des Digitoxinantiserums (Antiserumverdünnung 1 : 3 x $1o^{4}$)

In den Reaktionsansatz wurde 0,1 ml Antiserum eingesetzt (AS-Endverdünnung: 1 : 27 x $1o^{4}$)

im Äquilibriumzustand für Antigen-Antikörperreaktionen mit genügender Genauigkeit durch die sog. Sättigungsmethode bestimmen läßt. Sie basiert auf einem Vorgehen analog der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für Enzyme.

Ein bestimmtes Volumen einer Antikörperverdünnung wird mit einer ansteigenden Menge an Hapten = ^{3}H-Digitoxin gesättigt, so daß eine Sättigungskurve erhalten wird (Abb. 8). Nach Odell et al. (1969) entspricht die Menge der ungebundenen Fraktion bei 5o% Sättigung $1/_{K}$ der Äquilibriums- bzw. Aviditätskonstanten K. Da in der Regel in Antiseren verschiedene Antikörper mit verschiedenen Aviditäten enthalten sind, stellt K bei dieser Methode die durchschnittliche Aviditätskonstante bei 5o%iger Sättigung dar. Die Inkubation wurde nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 3.3.3. durchgeführt.

Aus Abb. 8 läßt sich die Konzentration des freien ^{3}H-Digitoxins bei 5o% Antikörpersättigung ablesen und die Aviditätskonstante wie folgt berechnen:

$$F\ (5o\%\ \text{Sättigung}) = T - B = 2,1 - 1,4 = 0,7 \times 1o^{-1o}\ M$$

$$K = \frac{1}{F\ (5o\%\ \text{Sättigung})} = \frac{1}{0,7 \times 1o^{-1o} M} = 1,43 \times 1o^{1o}\ M^{-1}$$

F = ungebundene ^{3}H-Digitoxinkonzentration bei 5o% Antikörpersättigung
T = totale ^{3}H-Digitoxinkonzentration bei 5o% Antikörpersättigung
B = antikörpergebundene ^{3}H-Digitoxinkonzentration bei 5o% Antikörpersättigung

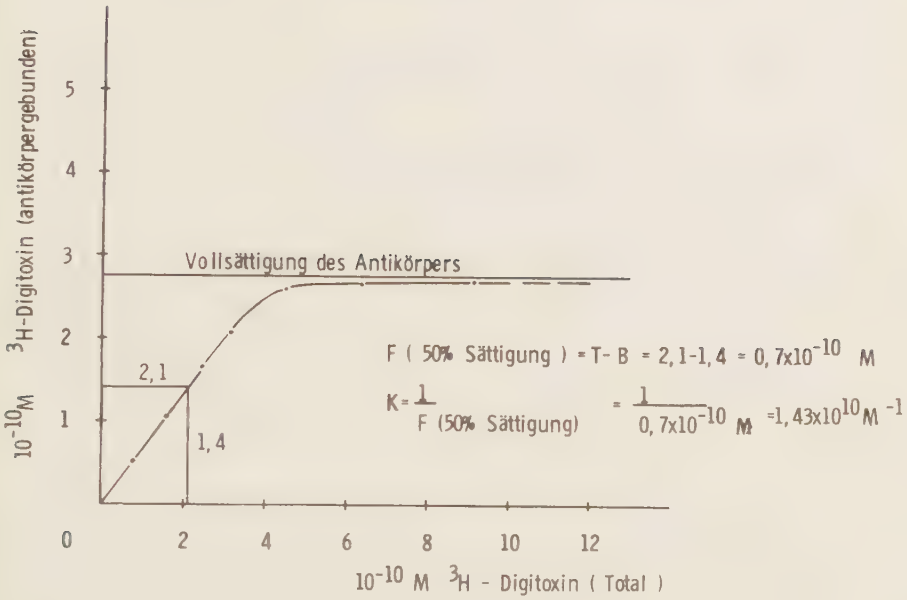


Abb. 8: Bestimmung der Aviditätskonstante des Digitoxin-Antikörpers.

Die Größe der Aviditätskonstanten K für diesen Digitoxinantikörper liegt mit 1,43 x $1o^{1o}$ M^{-1} in einem Bereich, den Smith, Butler und Haber (197o) bei ausgesprochen hochaviden Digoxinantikörpern fanden, während die ersten Digoxinantikörper von Butler und Chen (1967) wesentlich geringere Avidität aufwiesen.

Die freie Bindungsenergie ΔG des ^{3}H-Digitoxin-Antikörperkomplexes wurde für eine Inkubationstemperatur von 4 ^{o}C nach folgender Formel berechnet (Lehninger 1976):

$$\Delta G = - R \times T \times \ln K = - R \times T \times 2,3o3 \log K$$

$$R = 1,987 \text{ cal Grad}^{-1} \text{ Mol}^{-1}$$

$$T = 273 + 4 \text{ Grad}$$

$$K = 1,43 \times 1o^{1o}$$

$$\Delta G = - 1,987 \times 277 \times 2,3o3 \log 1,43 \times 1o^{1o}$$

$$\Delta G = - 1,987 \times 277 \times (0,358 + 23,o3)$$
$$= - 55o,4 \times 23,39 = - 12872,8 \text{ cal/Mol}$$
$$= - 12,8728 \text{ Kcal/Mol}$$

ΔG = freie Bindungsenergie
T = absolute Temperatur
R = universelle Gaskonstante
K = Aviditäts- bzw. Äquilibriumskonstante

Die freie Bindungsenergie des ^{3}H-Digitoxinantikörperkomplexes übertrifft mit - 12,87 Kcal/Mol um das 2,2fache den Wert für die Bindungsenergie der Digitoxin-Albuminbindung, die nach Untersuchungen von Lukas und de Martino (1969) bei einer Inkubationstemperatur von 1 ^{o}C - 5,84 Kcal/Mol betrug.

3.3.5. Einfluß des Serumvolumens und der Albuminkonzentration im Inkubationsansatz auf die Antikörperbindung von Digitoxin

Zu den unspezifischen Beeinflussungsmöglichkeiten der Antigen-Antikörperbindung gehört der hemmende Einfluß von ansteigenden Albuminkonzentrationen im Inkubationsansatz oder unterschiedlichen Eiweißkonzentrationen im Patientenserum. Das Ausmaß hängt von der Avidität des verwandten Antikörpers ab. Je höher die relative Avidität des Antikörpers zum Digitoxinmolekül ist, umso geringer wird sich diese Interferenz auf das Ergebnis auswirken. In allen Experimenten wurde ein Phosphatpuffer verwandt, der 0,5 g% Rinderserumalbumin enthielt, um den Antikörper in seinen physikochemischen Eigenschaften zu stabilisieren.

Abbildung 9 zeigt den Einfluß des Serumvolumens auf die Antikörperbindung von ^{3}H-Digitoxin in Abwesenheit von unmarkiertem Digitoxin. Bei Verminderung des Serumvolumens von 100 µl auf 50 µl ergibt sich eine Änderung der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung von 2,7%. Bei Erhöhung des Serumvolumens von 100 µl auf 200 µl wird die Antikörperbindung um weniger als 4,6% vermindert. Da beide Möglichkeiten Extreme darstellen und die gemessenen Abweichungen der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung gering sind, ist der Einfluß des eingesetzten Serumvolumens für die Genauigkeit der Messung nicht von wesentlicher Bedeutung.

Abbildung 10 zeigt den Einfluß von verschiedenen Albuminkonzentrationen im Inkubationsansatz (0,5 - 4,5 g% Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer) auf die Standardeichkurve. Danach läßt sich weder eine statistisch signifikante Beeinflussung der maximalen Antikörperbindung noch eine Änderung der Steilheit des Eichkurvenverlaufs nachweisen.

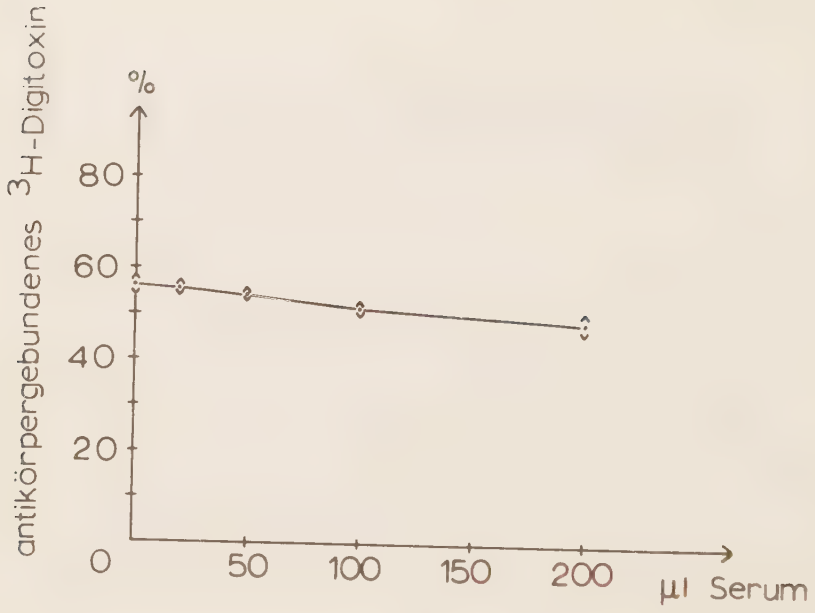


Abb. 9: Einfluß des Serumvolumens auf die maximale Bindung des ^{3}H-Digitoxin-Antikörperkomplexes (%) bei Verwendung des Digitoxin-Antiserums.

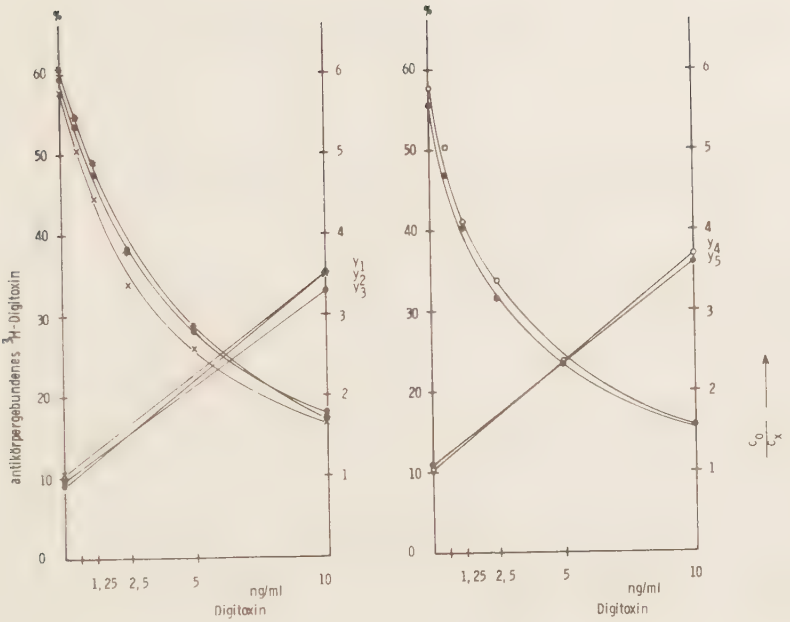


Abb. 1o: Eichkurven bei verschiedenen Albuminkonzentrationen im Ansatz.

—— Albuminkonzentration: 0,5 g%,
$y_1 = 0{,}26o4x + 0{,}919o$

◎——◎ Albuminkonzentration: 1,o g%,
$y_2 = 0{,}2318x + 0{,}9658$

x——x Albuminkonzentration: 2,5 g%,
$y_3 = 0{,}2473x + 1{,}0278$

o——o Albuminkonzentration: 4,o g%,
$y_4 = 0{,}2632x + 1{,}o4o1$

●——● Albuminkonzentration: 5,o g%,
$y_5 = 0{,}2462x + 1{,}o96o$

3.3.6. Einfluß der Bilirubinkonzentration in der Serumprobe auf den Radioimmunoassay von Digitoxin

Cerceo und Elloso (1972) wiesen als erste auf störende Interferenzen hoher Konzentrationen von Bilirubin bei der radioimmunologischen Bestimmung von Digitalisglykosiden hin.
Sie wurden allerdings nicht quantitativ untersucht. Da unser Digitoxinassay mit Tritium-markiertem Digitoxin durchgeführt wird, galt es erstens zu prüfen, welchen Einfluß das Bilirubin auf die Quenchkorrektur der meßbaren Radioaktivität des ^{3}H-Digitoxins hat.
Zweitens war es von Interesse, den Einfluß des Bilirubins auf die Adsorptionsfähigkeit der Dextran-Holzkohle für ^{3}H-Digitoxin zu prüfen.
Drittens sollte der Einfluß des Bilirubins auf die Antikörperbindung an ^{3}H-Digitoxin quantitativ erfaßt werden.

Aus Abb. 11 wird ersichtlich, daß die Korrektur der Radioaktivität von ^{3}H-Digitoxin bei verschiedenen Bilirubinkonzentrationen im Serum durch die Umrechnung der gemessenen Radioaktivität (cpm) in die wahre Radioaktivität (dpm) anhand der Quenchkurve

$$y = 81{,}2483 \; x \; - 17{,}8479$$

bis zu einer Bilirubinkonzentration von etwa 12,o mg% mit ausreichender Genauigkeit erreicht wird. Bei höheren Bilirubinkonzentrationen als 12 mg% wurde unter Berücksichtigung der Quenchkorrektur nur 89,4% der wahren Radioaktivität gemessen.

Abbildung 12 zeigt, daß die Adsorptionsfähigkeit der Dextran-Holzkohle für ^{3}H-Digitoxin ab Bilirubinkonzentrationen von 12,o mg% gering vermindert ist. Die Adsorptions-

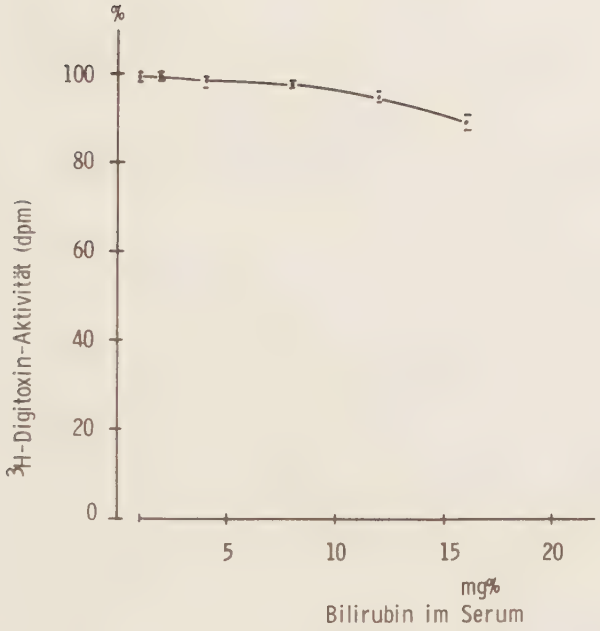


Abb. 11: Einfluß des Bilirubingehalts im Serum auf die quenchkorrigierte ^{3}H-Digitoxin-Aktivität (dpm).

Mittelwert und Standardabweichung

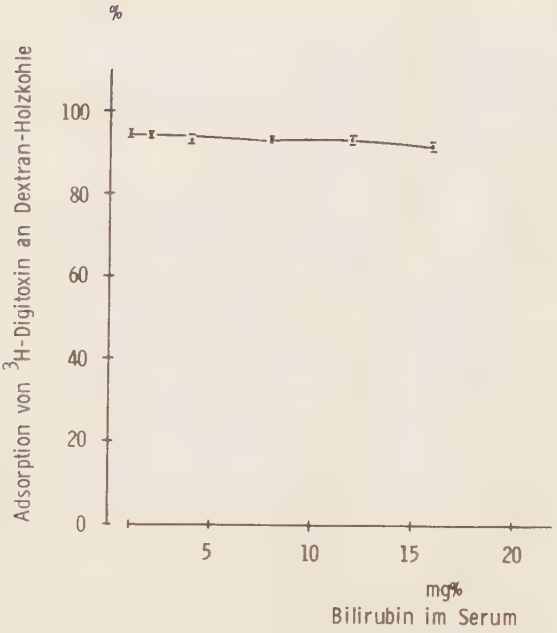


Abb. 12: Einfluß des Bilirubingehalts im Serum auf die Adsorption von ^{3}H-Digitoxin an Dextran-Holzkohle.

Mittelwert und Standardabweichung

quote betrug bei Bilirubinkonzentrationen im Serum von 1,o mg% 94,1 ± 0,8% (s) und von 16,o mg% 91,8 ± 0,8% (s).

In Abbildung 13 ist der Einfluß des Bilirubins auf die Antikörperbindung des ^{3}H-Digitoxins wiedergegeben, wobei der in Kapitel 3.4.3. beschriebene Inkubationsansatz gewählt wurde.
Mit ansteigenden Bilirubinkonzentrationen nimmt die maximale ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung von 42,o% auf 38,4% ab. Bis zu einer Bilirubinkonzentration von 4,o mg% ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Entsprechend zeigen die Eichkurven für Digitoxin bei zunehmenden Bilirubinkonzentrationen im Serum einen flacheren Verlauf, wobei die Steilheit der in eine Gerade transformierten Eichkurven von tan α = 0,1481 bei einem Bilirubingehalt des Serums von 1,o mg% auf tan α = 0,1050 bei 16,o mg% abnahm (Abb. 14).

Hieraus wird ersichtlich, daß bei einer höheren Bilirubinkonzentration der Serumprobe als 4 mg% nur dann eine ausreichende Genauigkeit der radioimmunologischen Messung von Digitoxin erreicht wird, wenn Eichkurven im Serummilieu erstellt werden und der Bilirubingehalt im Reaktionsansatz der Eichkurve mit dem der Serumprobe übereinstimmt.

3.3.7. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Assoziationskinetik des Antikörpers an Digitoxin

Wie Abb. 15 zeigt, ist die Digitoxin-Antikörperbindung bei der von uns gewählten Antiserumverdünnung und ^{3}H-Digitoxinmenge (s. Kapitel 3.4.3.) ein relativ schneller Prozeß. Nach 3o Minuten sind bei 22 °C und 4 °C bereits

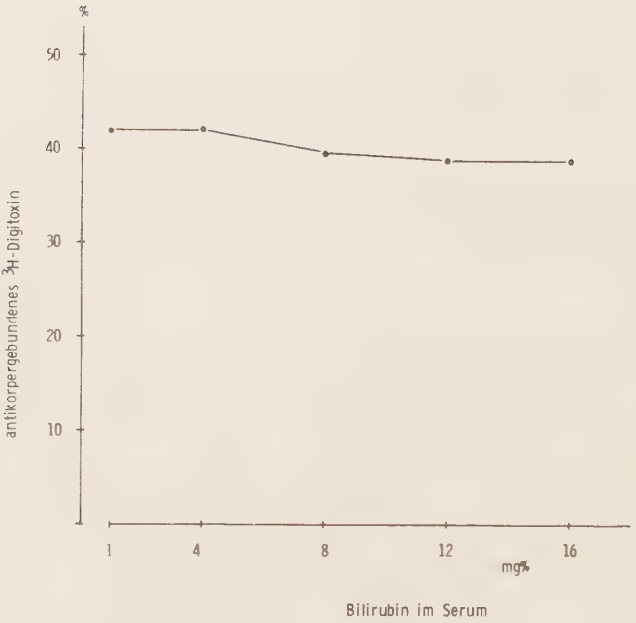


Abb. 13: Einfluß des Bilirubingehalts im Serum auf die maximale ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung.

9o% der Antigenbindungsstellen des Antikörpers abgesättigt. Niedrige Inkubationstemperaturen steigern die maximale Antikörperbindung, ohne die Bindungsgeschwindigkeit wesentlich zu beeinflussen. Die maximale Antikörperbindung bzw. der Äquilibriumzustand werden bei Inkubationstemperaturen von 4 °C und 22 °C nach ca. 6o Minuten erreicht. Die maximale Antikörperbindung läßt sich durch Senkung der Inkubationstemperatur von 22 °C auf 4 °C um 1o - 15% steigern.

Durch Temperatursenkung läßt sich demnach nur unwesentlich die Assoziationsgeschwindigkeit beeinflussen, wohl aber das Äquilibrium in dem Sinne verändern, daß die maximale Bindung erhöht wird.

3.3.8. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Dissoziationskinetik des Digitoxin-Antikörperkomplexes

Von wesentlicher Bedeutung für die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit eines Assays ist die Festlegung der Bedingungen der Trennung des antikörpergebundenen von dem freien Digitoxin. Die Stabilität des Digitoxin-Antikörperkomplexes ist je nach Avidität des Antikörpers unterschiedlich. Die Dissoziationskonstante stellt eine für jeden Antikörper typische Eigenschaft dar (Smith und Skubitz 1975). Wie die Assoziationsgeschwindigkeit wird auch die Dissoziationsgeschwindigkeit von der Inkubationstemperatur beeinflußt. Der von uns bis 1975 für den Digitoxinassay verwandte Digoxinantikörper hatte eine geringere Avidität zum Digitoxin als der spezifische Digitoxin-Antikörper. Es bestand entsprechend eine stärkere zeitabhängige Dissoziation des ^{3}H-Digitoxin-Antikörperkomplexes. Die Dissoziationsgeschwindigkeit ließ sich bei diesem Digoxin-Antikörper durch niedrige Temperaturen deutlich verlangsamen.

Bei dem von uns verwandten Digitoxin-Antikörper mit hoher Avidität betrug die maximale Dissoziation bei 4 °C nach 1 Stunde lediglich 12% im Vergleich zu 57% beim Digoxin-Antikörper (Abb. 16). Bei erheblich dissozierendem Antigen-Antikörperkomplex muß die Trennzeit mit Dextran-beschichteter Holzkohle in einer Serie für alle Proben konstant gehalten werden.

3.3.9. Trennung des antikörpergebundenen vom freien Digitoxin mit Dextran-beschichteter Holzkohle
(Methode nach Herbert et al. 1965)

Beim Radioimmunassay für Digitalisglykoside hat sich zur Trennung von antikörpergebundenem und freiem Digitoxin die Adsorptionsmethode mit Dextran-beschichteter Holzkohle bewährt.
Wie sich bei Vorversuchen zeigte, werden gleich gute Resultate in der prozentualen Bindung von freiem ^{3}H-Digitoxin und in der Trennleistung zwischen antikörpergebundenem und freiem ^{3}H-Digitoxin erzielt, gleichgültig, ob zur Beschichtung der Holzkohle Dextran mit einem Molekulargewicht von 1o ooo oder 5oo ooo verwandt wird.
Die Konzentration der Holzkohle betrug in allen Versuchen 1,o g% und die des Dextrans O,1 g%.
Mehr als 97% des freien ^{3}H-Digitoxins (O,654 pmol = O,5 ng ≙ 7,2 n Ci) wurden von der Dextran-beschichteten Holzkohle gebunden. Die Dextran-beschichtete Holzkohle ließ sich ohne Wirkungsverlust im Kühlschrank bis zu 4 Wochen aufbewahren.
Die Beschichtung der Holzkohle haben wir folgendermaßen durchgeführt:

a) 1 g Holzkohle (Norit A-Partikelgröße 4 - 5 µ, Fa. Serva, Feinbiochemica) und 1oo mg Dextran T 7o (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden), wurden in je 5o ml O,O1 molarem Phosphatpuffer

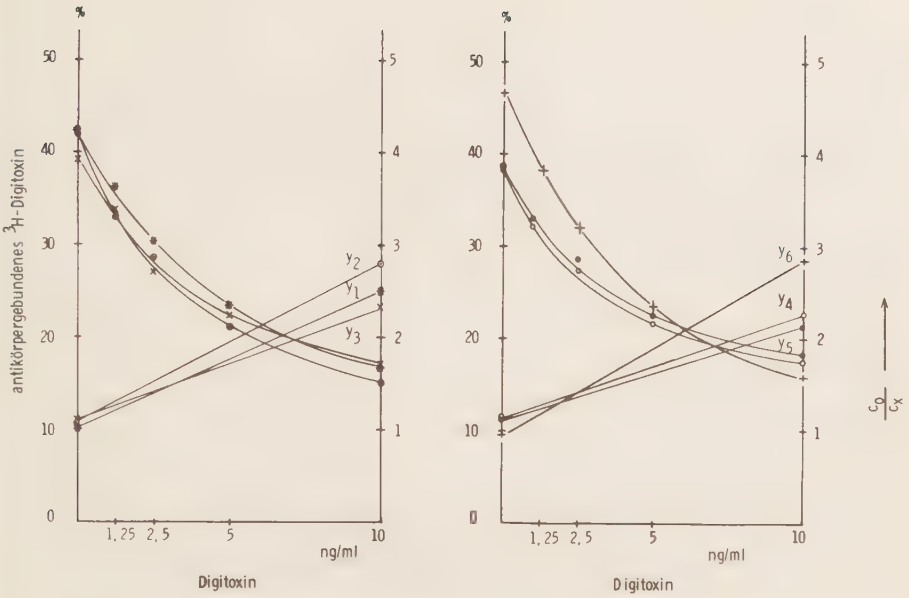


Abb. 14: Eichkurven zur Bestimmung von Digitoxin im Serum bei verschiedenen Bilirubinkonzentrationen.

—— Bilirubin im Serum: 1 mg%,
$y_1 = 0{,}1481x + 1{,}0308$

⊙——⊙ Bilirubin im Serum: 4 mg%,
$y_2 = 0{,}1725x + 1{,}0915$

×——× Bilirubin im Serum: 8 mg%,
$y_3 = 0{,}1196x + 1{,}1394$

○——○ Bilirubin im Serum: 12 mg%,
$y_4 = 0{,}1126x + 1{,}1222$

●——● Bilirubin im Serum: 16 mg%,
$y_5 = 0{,}1050x + 1{,}0829$

+——+ Normalserum, das zur Verdünnung der Bilirubinseren verwandt wurde.
$y_6 = 0{,}1891x + 0{,}9801$

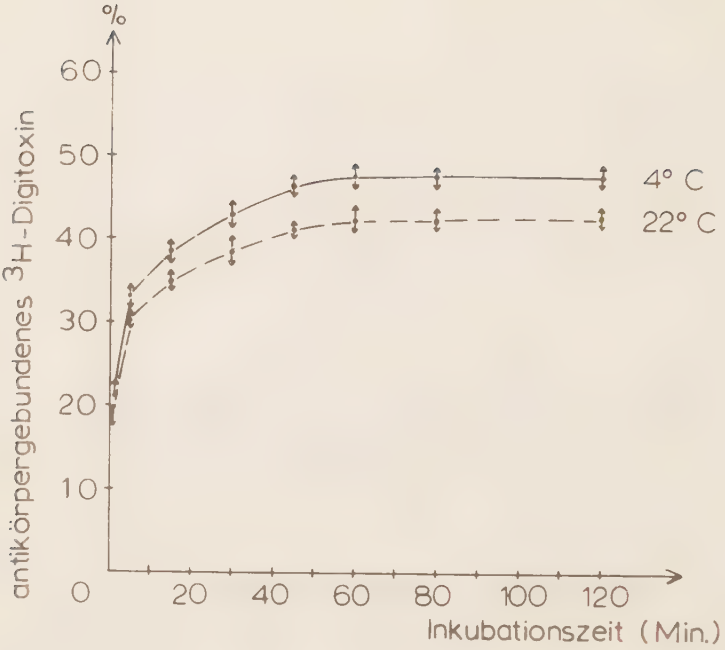


Abb. 15: Abhängigkeit der Assoziationskinetik des Antikörpers an ^{3}H-Digitoxin von der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur.

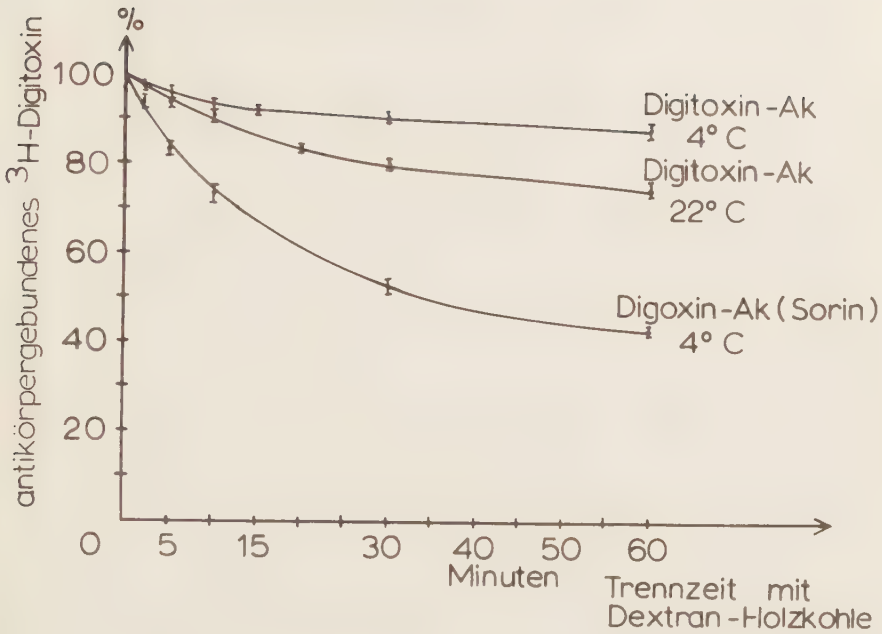


Abb. 16: Abhängigkeit der Dissoziationskinetik des ^{3}H-Digitoxin-Antikörperkomplexes von der Trennzeit mit Dextran-Holzkohle und der Inkubationstemperatur bei zwei verschiedenen Antiseren.

Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

(pH = 7,4) bei 4 °C gelöst und 1o Minuten lang mit einem Magnetrührer gerührt.

b) Holzkohle und Dextranphosphatpufferlösung wurden dann gemischt und 3o Minuten lang im Eisbad von 4 °C gerührt.

In den Radioimmunoassay wurden zur Trennung bei einem Inkubationsvolumen von 0,9 ml 0,5 ml Dextran-Holzkohle zugesetzt. Die Trennzeit betrug bei den Antikörpern mit geringer relativer Avidität gegenüber Digitoxin (Sorin RIA Kit) genau 15 Minuten.
Es waren in einem Set nur so viele Proben zusammengefaßt, wie in einer Minute pipettiert werden konnten (14 Ansätze).
In dieser Zeit war die Änderung der ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung zu vernachlässigen (Peters et al. 1974).

Bei dem Digitoxin-Antikörper konnten längere Serien pipettiert werden, da die Dissoziation des Antigen-Antikörperkomplexes für die Genauigkeit der Bestimmung keine Fehlerquelle darstellte.

3.4. Aufstellung eines Radioimmunoassays für Digitoxin

3.4.1. Herstellung des Rinderserumalbumin-Phosphatpuffers, der Digitoxinstandardlösung, der ^{3}H-Digitoxin Stammlösung und der Digitoxin-Antikörperverdünnung

Phosphatalbumin-Puffer (Phosphat 0,01 M in 150 m M Na Cl, pH = 7,4, Rinderserumalbumin = 0,5%
Gelöst wird:

1,392 g $K_2 HPO_4$ (MG = 174,2),
0,276 g $Na H_2 PO_4 \times H_2O$ (MG = 138,0) und
8,77 g Na Cl (MG = 58,5) in 900 ml zweifach destilliertem Wasser.

Das pH von 7,4 wird mit 0,1 N KOH-Lösung eingestellt, und das endgültige Volumen mit H_2O auf 1000 ml gebracht. In 1 l Phosphatpuffer werden 5 g Rinderserumalbumin (Behringwerke, Marburg) gelöst.
Im Kühlschrank ist der Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer bis zu 4 Wochen haltbar.

Digitoxin-Serumstandardlösung
Für die Standardlösung wird dünnschichtgraphisch reines Digitoxin verwandt (Fa. Boehringer, Mannheim). Die Digitoxin-Stammlösung wird durch Lösung von 10 mg Digitoxin in 10 ml absolutem Alkohol hergestellt (1 mg/ml). Diese Lösung ist mindestens 1 Jahr haltbar. Die Standardverdünnungen werden mit humanem Serum in folgenden Konzentrationen 0,625 ng/ml, 1,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 5,0 ng/ml, 10,0 ng/ml und 20,0 ng/ml hergestellt.

^{3}H-Digitoxin-Stammlösung
^{3}H(G)-Digitoxin, markiert am Steroidkern, spezifische Aktivität = 14,3 m Ci/mg (New England Nuclear Corporation, Boston, Mass.). Als Stammlösung wurde eine Verdünnung von

1 : 14o (abs. Alkohol) im Kühlschrank aufbewahrt. Das ^{3}H-Digitoxin wurde radiochromatographisch in zwei Laufmittelsystemen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie überprüft. Die Reinheit betrug mehr als 97% (s. Kapitel 3.2.1.).
Vor Einsatz in den Assay wird diese Stammlösung nochmals 1 : 1oo mit Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer verdünnt. Bei Untersuchungen von Serumproben werden 0,1 ml = 0,654 pmol der ^{3}H-Digitoxin-Stammlösung (= 0,5 ng ≙7,2 n Ci = 15984 dpm) in den Ansatz eingegeben.

Digitoxin-Antikörperlösung
Das unverdünnt eingefrorene Kaninchen-Digitoxinantiserum wird vor Gebrauch aufgetaut und mit 0,85% Na Cl 1 : 1o verdünnt. Auf 1o ml Antiserumverdünnung werden 1o mg Rindergammaglobulin(Behringwerke, Marburg) zugesetzt (0,1 g%).
Vor Einsatz in den Assay wird das Antiserum mit 0,85% Na Cl, das 0,1% Rindergammaglobulin enthält, auf eine Verdünnung von 1 : 3o ooo gebracht.
Diese Antiserumverdünnung wird im Ansatz nochmals 9fach verdünnt, so daß eine Endverdünnung von 1 : 27o ooo resultiert.

3.4.2. Pipettierschema beim Digitoxin-RIA

In der folgenden Tabelle 3 ist das Pipettierschema für die Bestimmung von Digitoxin im Serum aufgeführt.

3.4.3. Analysenvorgang bei der Bestimmung einer Serumprobe

1. In Einmalröhrchen 1,2 und 3 - 2o werden 1,2 bzw. 0,6 ml eiskalter 0,5% Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer pipettiert (s. Protokoll).

Ansatz zur Bestimmung von Digitoxin im Serum

	Röhrchen-nummer+	PBS-Puffer+	digitoxin-freies Serum+	Serum-standard+	^{3}H-Digitoxin+	Antiserum+	Dextran-Kohle+	Patienten- bzw. Kontroll-serum+
Total-radioaktivität	1-2	1,2	0,1	0	0,1	0	0	0
maximale Bindung	3-4	0,6	0,1	0	0,1	0,1	0,5	0
Serum-standard	5-16	0,6	0	0,1	0,1	0,1	0,5	0
Probe	17-18	0,6	0,05 bzw. 0,075	0	0,1	0,1	0,5	0,05 bzw. 0,025
Kontroll-serum++	19-20	0,6	0,05 bzw. 0,075	0	0,1	0,1	0,5	0,05 bzw. 0,025
Leerwert	21-22	0,7	0,1	0	0	0,1	0,5	0

Tab. 3: + alle Volumina sind in ml angegeben
++ Kontrollseren mit Digitoxinkonzentrationen von 5,o ng/ml, 1o,o ng/ml und 2o,o ng/ml

Konstant sind 1. das Inkubationsvolumen = 0,9 ml und Ansatzvolumen von = 1,4 ml
2. die Inkubationszeit von 1 Std. bei 4 °C und die Trennzeit mit eisgekühlter Dextran-beschichteter Holzkohle von 15 Minuten

2. Pipettiert werden zu Röhrchen 1 - 4 0,1 ml und zu Röhrchen 17 - 2o 0,05 bzw. 0,075 ml digitoxinfreies Serum, zu Röhrchen 5 - 16 0,1 ml Serumstandard (Konz. 0,625 - 2o,o ng/ml) und Röhrchen 17 - 2o 0,025 bzw. 0,05 ml Patienten- bzw. Kontrollserum.
3. Zu allen Proben werden 0,1 ml = 0,5 ng ≙ 7,2 n Ci ^{3}H-Digitoxin pipettiert.
4. Pipettiert werden mit Ausnahme von Röhrchen 1, 2 0,1 ml der Antiserumverdünnung 1 : 3o ooo. Der Reaktionsansatz wird mit einem Vortexmixer gut gemischt und im Kühlschrank bei 4 ^{o}C 1 Stunde lang inkubiert.
5. Pipettiert wird zu allen Röhrchen mit Ausnahme von 1 und 2 0,5 ml der eigekühlten, gut gemischten, Dextran-beschichteten Holzkohle. Danach wird erneut 15 Sekunden mit einem Vortexmixer gut gemischt. Die Einwirkungszeit beträgt 15 Minuten bei 4 ^{o}C.
6. Die Zentrifugation erfolgt in einer Kühlzentrifuge bei 4 ^{o}C und 2ooo g für 1o Minuten.
7. 1 ml des Überstandes (= antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin) wird in Zählröhrchen überführt und mit 1o ml Szintillator (Aquasol^{R}, NEN, Boston) versetzt.

Die Zählung der ^{3}H-Aktivität erfolgt in einem Flüssigkeitsszintillationszähler mit einem automatischen externen Standard (Packard Tricarb, Modell 338o).

3.4.4. Eichkurvenverlauf bei der Bestimmung der Serumdigitoxinkonzentration

Abbildung 17 zeigt die mittlere Serumeichkurve aus 5o Bestimmungen mit folgender transformierten Funktion:

$$y = 0{,}1903x + 0{,}9780$$

Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient betrug 0,9982 $\pm$ 0,01 (VK = 1%). Der Schnittpunkt mit der Ordinate, der theoretisch 1 ist, lag bei diesen 5o Eichkurven bei 0,9780 $\pm$ 0,0265 (VK = 2,7%). Die mittlere Steigung der Geraden wurde mit 0,1903 $\pm$ 0,0125 (VK = 6,6%) errechnet. Die maximale Antikörperbindung für ^{3}H-Digitoxin betrug durchschnittlich 46,8 $\pm$ 3,2% (VK = 6,4%).

Die größte Genauigkeit der Messung wird in dem Meßbereich zwischen 0,625 ng/ml und 1o,o ng/ml erreicht.

Da bei Patienten etwa 9o% der Serumdigitoxinspiegel in dem Bereich von 5,o und 4o,o ng/ml liegen, wird das Probenvolumen vor Einsatz in den Assay 1 : 2 bzw. 1 : 4 mit Humanserum verdünnt.

3.5. Mathematische Transformation der Eichkurve in eine Gerade

Bei jeder Bestimmungserie für Digitoxin wurde eine Eichkurve mit den Digitoxinstandardverdünnungen von 0,625 - 2o,o ng/ml erstellt.
Durch Bildung des Quotienten c_o/c_x wird die Hyperbel in eine Gerade transformiert.

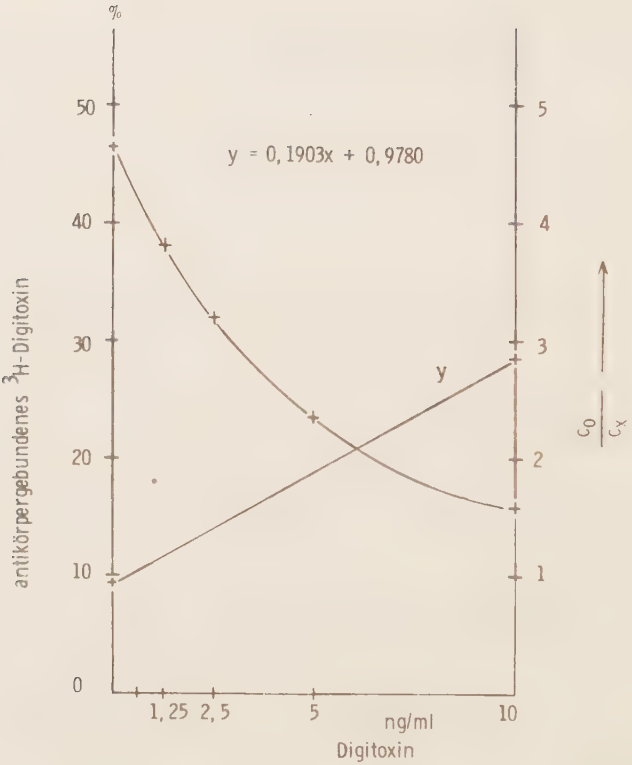


Abb. 17: Eichkurve zur Bestimmung von Digitoxin im Serum.

C_0 = antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin in Abwesenheit von unmarkiertem Digitoxin.

C_x = antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin in Anwesenheit von unmarkiertem Digitoxin.

c_o = antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin bei Abwesenheit von unmarkiertem Digitoxin

c_x = antikörpergebundenes ^{3}H-Digitoxin in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des unmarkierten Digitoxins

Die Quenchkorrektur der cpm in dpm wird nach der Quenchkurve

$$y = 81,2483\ x - 17,8479$$

vorgenommen. Der Korrelationskoeffizient r betrug hierfür 0,9901. 12 Wertepaare mit Quenchwerten zwischen 0,4357 und 0,7722 gingen in die Quenchkurve ein.
Die Ermittlung der Digitoxinskonzentration im Serum erfolgte anhand der transformierten Gerade mit Hilfe eines Tischrechnerprogramms (Olivetti 101).

3.6. Empfindlichkeit der Digitoxinbestimmung im Serum

Die niedrigste Serumdigitoxinkonzentration, die signifikant von 0 ng/ml ($p < 0,01$) unterschieden werden konnte, lag für 10 Proben bei einem Probenvolumen von 0,1 ml bei 0,3 ng/ml Serum.

Die Empfindlichkeit des Assays lag in einem Bereich, der die Messung der Digitoxinkonzentration in einem Serumvolumen von 25 bzw. 50 µl erlaubte. Die unteren Nachweisgrenzen betrugen dann 0,625 ng/ml bzw. 1,25 ng/ml Serum.

3.7. Statistische Angaben zur Qualitätskontrolle

3.7.1. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Messung wurde mit Hilfe eingewogener Serumdigitoxinstandards bei jeder Bestimmung überprüft. Es wurden die Digitoxinkonzentrationen von 5,o , 1o,o und 2o,o ng/ml gewählt. Der Mittelwert des Serumdigitoxinstandards von 5 ng/ml lag (25 Messungen an verschiedenen Tagen) bei 4,9 ng/ml mit einer Schwankungsbreite von 4,4 - 5,5 ng/ml und einer Standardabweichung von 0,26 ng/ml. Beim Serumdigitoxinstandard von 1o,o ng/ml ergab sich ein entsprechender Mittelwert von 9,9 ng/ml mit einer Schwankungsbreite von 9,2 - 11,4 ng/ml. Die Standardabweichung betrug 0,66 ng/ml. Bei dem Serumstandard mit einer Konzentration von 2o,o ng/ml lag der Mittelwert bei 19,7 mit einer Schwankungsbreite von 18,2 - 22,o ng/ml und einer Standardabweichung von 1,o3 ng/ml.

3.7.2. Präzision

Alle Meßpunkte der Eichkurven und der Analysenproben wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Variationskoeffizienten für die Serumdigitoxinstandards 5,o ng/ml, 1o,o ng/ml und 2o,o ng/ml betrugen innerhalb einer Serie von 2o Einzelmessungen 3,6%, 5,8% und 3,7% bei den entsprechenden Mittelwerten von 4,9 $\pm$ 0,18, 1o,4 $\pm$ 0,61 und 2o,3 $\pm$ 0,74 ng/ml (s).

An 25 verschiedenen Tagen wurden Kontrollseren, die eine eingewogene Digitoxin-

konzentration von 5,o ng/ml, 1o,o ng/ml und 2o,o ng/ml enthielten, bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Variationskoeffizienten:

Digitoxinkonzentration von 5,o ng/ml —— VK = 5,3%
Digitoxinkonzentration von 1o,o ng/ml —— VK = 6,6%
Digitoxinkonzentration von 2o,o ng/ml —— VK = 5,2%

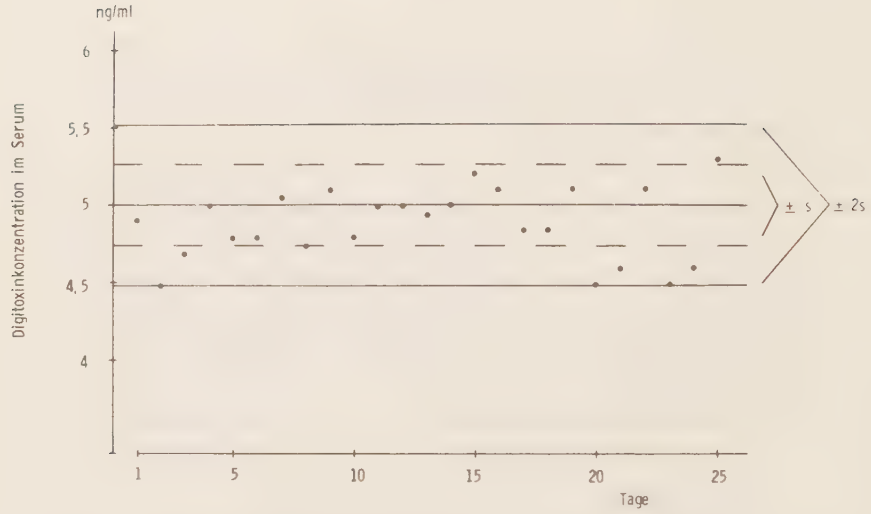
Abbildung 18 a und 18 b zeigen die Einzelwerte für die Kontrollseren mit den Digitoxinkonzentrationen 5,o ng/ml und 1o,o ng/ml über einen Zeitraum von 12 Monaten.
Eine entsprechende Dokumentation zur Qualitätskontrolle ist in unserem Labor einzusehen.

3.8. Aufbewahrung des Antiserums

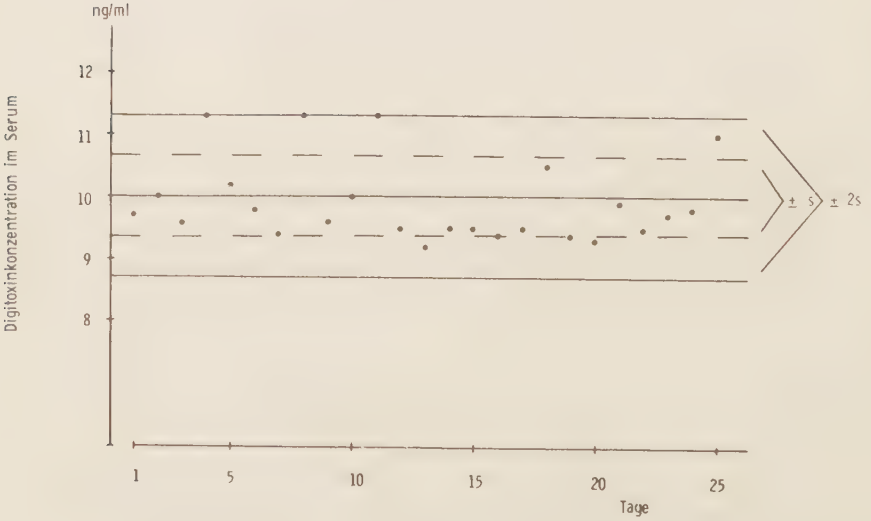
Das Antiserum wurde in kleinen Fraktionen unverdünnt bei - 2o ^{o}C eingefroren. Das zum Gebrauch vorgesehene Antiserum wurde mit 0,85% Na Cl-Lösung, die 0,1% Rindergammaglobulin (Fa. Behring, Marburg) enthält, 1 : 1o verdünnt und im Kühlschrank bei 4 ^{o}C aufbewahrt. Die Endverdünnung wurde vor jedem Versuch hergestellt. Das bei - 2o ^{o}C eingefrorene Antiserum zeigte nach 2 1/2 Jahren keinen Verlust an Avidität und Titer. Das im Kühlschrank aufbewahrte 1 : 1o verdünnte Antiserum zeigte über 2 - 3 Monate, wahrscheinlich auch länger, keine Änderung der Aktivität, während ein in der Endverdünnung aufbewahrtes Antiserum einen deutlichen Aktivitätsverlust nach einigen Tagen aufwies.

3.9. Messung der Eiweißbindung von Digitoxin im Serum

Die Eiweißbindung von Digitoxin wurde von uns in Anlehnung an die Methode von Scholtan et al. (1966) mit Hilfe der Ultrazentrifugation und radioimmunologischer Messung des



Einzelbestimmungen des Serumdigitoxinstandards von 5,0 ng/ml an verschiedenen Tagen (n = 25)



Einzelbestimmungen des Serumdigitoxinstandards von 10,0 ng/ml an verschiedenen Tagen (n = 25)

Abb. 18 a und b

freien Digitoxins im Überstand bestimmt. Gleichzeitig wurde im Serum das Gesamtdigitoxin gemessen. Der prozentuale eiweißgebundene Anteil ließ sich aus beiden Werten bestimmen. Die Sedimentation der Serumprobe (6 ml) erfolgte mittels der Ultrazentrifuge (MSE Superspeed, Rotor 241o) bei 45 ooo U/min entsprechend 15o ooo g für 16 Stunden. Die Rotortemperatur betrug 22 ^{o}C. Das Zentrifugat war dreigeschichtet. Die oberflächliche Lipoproteinschicht wurde nicht verwandt. In der mittleren Schicht erfolgte die radioimmunologische Digitoxinbestimmung. Die Abwesenheit von Eiweiß im Überstand wurde nach Lowry et al. (1951) kontrolliert.

Die Eichkurven wurden im eiweißfreien Milieu erstellt und in den Ansatz das 4 - 8fache des normalerweise verwandten Probenvolumens eingesetzt (Tab. 4).

Die in-vitro Eiweißbindung von ^{3}H-Digitoxin wurde im Serum von gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Lebererkrankung nach einer Vorinkubation von 1 Stunde bei 37 ^{o}C bestimmt. 1oo nCi ≙ 7 ng ^{3}H-Digitoxin (spez. Aktivität: 14,3 mCi/mg) wurden zur Serumprobe (2 ml) zugesetzt. Die ^{3}H-Digitoxinkonzentration betrug 3,5 ng/ml. Die Messung des eiweißgebundenen Anteils erfolgte nach Sedimentation mit der Ultrazentrifuge (45 ooo U/min, Rotor 241o, mit Einsätzen für 2 ml Probenvolumina, MSE Superspeed). Das Volumen des Ultrazentrifugats ließ sich volumetrisch leicht bestimmen. Als Bezugsgröße diente die Messung der ^{3}H-Digitoxinaktivität im Inkubationsansatz. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in dem bereits beschriebenen Flüssigkeitsszintillationszähler mit zusätzlicher Quenchkorrektur.

Ansatz zur Bestimmung von Digitoxin im Ultrazentrifugat

	Röhrchen-nummer[+]	PBS-Puffer[+]	Standard-lösungen[+]	^{3}H-Digitoxin[+]	Antiserum[+]	Dextran-Kohle[+]	Ultrazentrifugat[+]
Total-radioaktivität	1-2	1,3	0	0,1	0	0	0
maximale Bindung	3-4	0,7	0	0,1	0,1	0,5	0
Standard-lösungen[++]	5-14	0,6	0,1	0,1	0,1	0,5	0
Probe	15-16	0,5	0	0,1	0,1	0,5	0,2
Leerwert	17-18	0,8	0	0	0,1	0,5	0

\+ alle Volumina sind in ml angegeben

++ Standardkonzentrationen von 0,313 - 5,0 ng/ml Digitoxin

Tab. 4

3.1o. Bestimmung von Digitoxin im Urin

Untersuchungen von Greenwood et al. (1975) zeigten, daß sich ohne gravierende Interferenzen auch im Urin Digoxin radioimmunologisch messen läßt.
Bei der Bestimmung der Digitoxinkonzentration im Urin war lediglich eine 1 : 2 Vorverdünnung des Urins mit digitoxinfreiem Urin notwendig, da die gemessenen Digitoxinkonzentrationen in einem Bereich lagen, die denen im Serum entsprachen. Die maximale ^{3}H-Digitoxin-Antikörperbindung betrug bei 15 Eichkurven im Mittel 48,o $\pm$ 4,o% (s). Die Bestimmung wurde nach dem in Tab. 5 angegebenen Reaktionsansatz durchgeführt.

3.11. Radioimmunoassay für Digoxin

Die Bestimmung der Digoxinkonzentration im Serum wurde mit einer im Handel erhältlichen Testkombinationspackung durchgeführt (Becton Dickinson Digoxin Radioimmunoassay Kit (^{3}H), Orangeburg, N.Y.). Die Vorschriften brauchten wegen guter Reproduzierbarkeit der Werte nicht modifiziert zu werden (Drug Assay Lab., Medical School, Stanford, USA).

Folgender Ansatz wurde für die Serum-Digoxinbestimmung verwandt:

600 µl = 0,5% Rinderserumalbumin-Phosphatpuffer (0,01 M Kalium-, Natriumphosphat in 0,15 M Natriumchlorid, pH 7,4)
200 µl = Serumstandard (0,5 - 5,0 ng/ml) bzw. Patientenprobe
100 µl = ^{3}H-Digoxin (0,6 ng $\triangleq$ 14,4 nCi = 32 000 dpm) in 5% Äthanol
200 µl = Digoxinantiserum in 0,01 M Phosphatpuffer
500 µl = Dextran-beschichtete Holzkohle (11 mg/ml)

Ansatz zur Bestimmung von Digitoxin im Urin

	Röhrchen-nummer[+]	PBS-Puffer[+]	digitoxin-freier Urin[+]	Standard-lösungen[+]	^{3}H-Digitoxin[+]	Antiserum[+]	Dextran-Kohle[+]	Urinprobe[+]
Total-radioaktivität	1-2	1,2	0,1	0	0,1	0	0	0
maximale Bindung	3-4	0,6	0,1	0	0,1	0,1	0,5	0
Standard-lösungen	5-16	0,6	0	0,1	0,1	0,1	0,5	0
Probe	17-18	0,6	0,05 bzw. 0,075	0	0,1	0,1	0,5	0,05 bzw. 0,025
Kontrollurin[++]	19-20	0,6	0,05 0,075	0	0,1	0,1	0,5	0,05 0,025
Leerwert	21-22	0,7	0,1	0	0	0,1	0,5	0

\+ alle Volumina sind in ml angegeben

++ Standardkonzentrationen von 0,625 - 20,0 ng/ml Digitoxin

Konstant sind 1.) das Inkubationsvolumen = 0,9 ml
und Ansatzvolumen von = 1,4 ml

2.) die Inkubationszeit von 1 Std. bei 4° C und die Trennzeit mit eisgekühlter dextranbeschichteter Holzkohle von 15 Minuten.

Tab. 5

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 3o Minuten und die Trennung des antikörpergebundenen vom freien Digoxin mit Dextran-Holzkohle durch Zentrifugation (1o Minuten bei 2ooo g).
Die maximale ^{3}H-Digoxin-Antikörperbindung betrug in Abwesenheit von unmarkiertem Digoxin 45,8 $\pm$ 1,9% (s).
Der Überstand wurde dekantiert und in 1o ml Szintillationslösung (Aquasol^{R}, NEN, Boston, Mass.) überführt.
Als Kontrollseren wurden ein Poolserum von 2 ng/ml und ein Kontrollserum mit einer Digoxinkonzentration von 1,o ng/ml mitgeführt. Dabei ergaben sich Variationskoeffizienten von Tag zu Tag (2o Bestimmungen) von 4,1 bzw. 8,5%.
Nach Angaben des Herstellers bestand keine signifikante Kreuzreaktivität gegenüber Spironolacton, Canrenon, Cholesterin, Östradiol, Furosemid, Cortisol und Progesteron.
Die Kreuzreaktivität für Digitoxin betrug 6% und für Dihydrodigoxin 3o%.
Die mittlere Standardeichkurve aus 2o Bestimmungen hatte folgende Funktion:

$$y = 0{,}4286\ x + 0{,}9727$$

Der mittlere Korrelationskoeffizient r betrug: 0,9985.
Der Meßbereich lag zwischen 0,5 und 5,0 ng/ml.

3.12. Dünnschichtchromatographie als Verfahren zum Studium des Metabolismus von ^{3}H-Digitoxin

Zum Studium des Metabolismus von Digitoxin wurden die Radioisotopenmethode unter Verwendung von ^{3}H-Digitoxin und die Dünnschichtchromatographie angewandt.

3.12.1. Stabilität und Reinheit von ^{3}H-Digitoxin

Das ^{3}H-(G)-Digitoxin (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) ist ein stabiles Radioisotop, das durch katalytischen Austausch von Tritiumatomen gegen Wasserstoffatome (Platin als Katalysator) hergestellt wurde. Die Tritiumatome sind nach Angaben des Herstellers fest an Kohlenstoffatome, meist im Laktonring, gebunden (C_{21} - C_{22}). Sie können aus dieser Bindung nur in Anwesenheit von Katalysatoren gegen Wasserstoff ausgetauscht werden.
Das von uns verwandte ^{3}H-(G)-Digitoxin hatte eine spezifische Aktivität von 14,3 mCi/mg. Die radiochemische Reinheit betrug in zwei Fließmittelsystemen 97% und 99% (s. Kapitel 3.2.1.).

Nach kompletter Säurehydrolyse bei pH 1 (alkoholische $\frac{n}{10}$ HCl-Lösung) betrug die Wiederfindungsrate der ^{3}H-Aktivität nach Dichlormethanextraktion 99,2%. Dünnschichtchromatographisch fand sich nach kompletter Säurehydrolyse lediglich ^{3}H-Digitoxigenin. Beide Untersuchungen zeigten, daß sich das Tritium im Genin befindet (Abb. 19 a, 19 b).

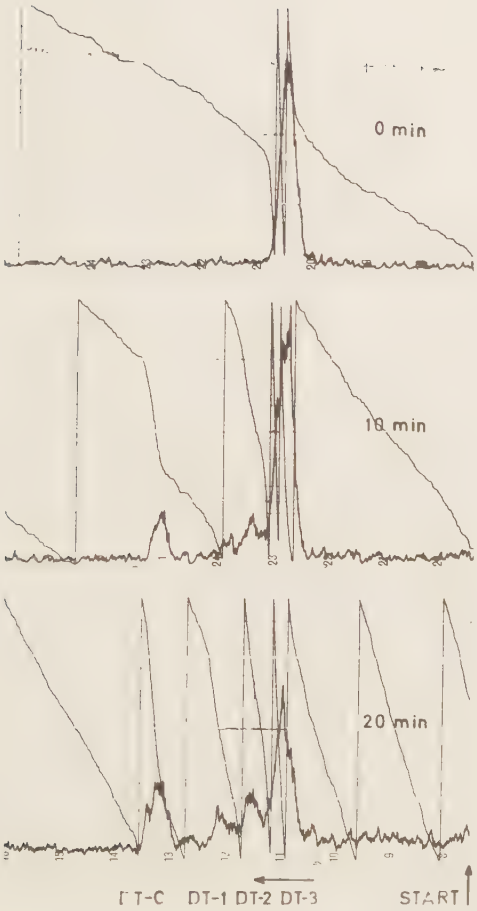


Abb. 19 a: Radiochromatogramm von ^{3}H-Digitoxin und seinen hydrolytischen Metaboliten nach Säurehydrolyse bei pH 1 zu verschiedenen Inkubationszeiten.

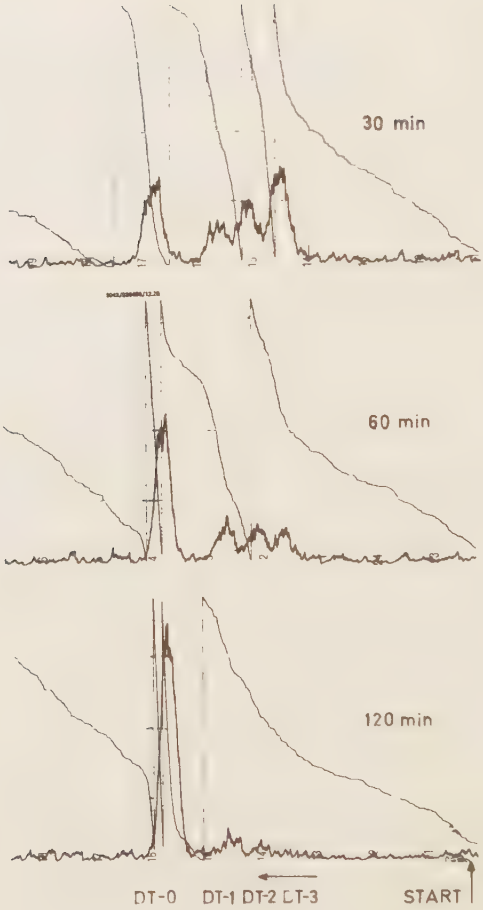


Abb. 19 b: Radiochromatogramm von ^{3}H-Digitoxin und seinen hydrolytischen Metaboliten nach Säurehydrolyse bei pH 1 zu verschiedenen Inkubationszeiten.

3.12.2. Quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen

Die Nachweisempfindlichkeit für ^{3}H-Radiosiotope liegt bei etwa 5 - 1o pg. Die quantitative Auswertung von Radiochromatogrammen erfolgte mit einem automatischen Scanner durch Integration der Peakflächen oder Zählung der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler. Die Ausbeute der Radioscanmethode lag nach gemeinsamen Untersuchungen mit Herrn Funke (Physiologische Chemie, Düsseldorf) für Tritium-markiertes Digitoxin bei 1,5 - 3% und für ^{14}C-Substanzen bei 3o% (Berthold LB 2721). Beim Flüssigkeitsszintillationszähler betrug sie 66%. Die direkte Scanmethode bietet allerdings demgegenüber den Vorteil der Identifizierung von Metaboliten aufgrund der Vergleichsmöglichkeit der R_F-Werte von Metabolitenpeak und Standardsubstanz.

3.12.3. Fließmittelsysteme zur Trennung von Digitoxin- und Digoxinmetaboliten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie von Herzglykosiden stehen Fertigplatten mit verschiedenen Adsorbentien zur Verfügung. Wir verwandten Kieselgel GF_{254} mit einer Partikelgröße von 6o Å (Schichtdicke 0,25 mm), dem als Binder Calciumsulfat und außerdem ein Fluoreszenzindikator zugesetzt ist (Fa. Merck, Darmstadt). Für spezielle Untersuchungen z.B. der Tennung von 2o, 22 dihydrierten Geninen des Digitoxins und Digoxins werden Al_2O_3-Platten (Luchi und Gruber 1968) oder für die Trennung von Digoxin und Dihydrodigoxin oder Digitoxin und Dihydrodigitoxin Celluloseplatten verwandt (Rabitzsch 1968). Zur Trennung von hydroxylierten und nichthydroxylierten Metaboliten des Digitoxins wurden die Kieselgelplatten mit 12%

Formamid/Aceton Lösung imprägniert (Storstein 1973, 1976) (Abb. 2o). Um die Trennleistung von Aluminiumoxidplatten für Digoxigenin und Dihydrodigoxigenin zu erhöhen, wurden sie 1 1/2 Stunden bei 11o ^{o}C aktiviert (Abb. 43). Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Raum haben auf die R_F-Werte der Metaboliten und die Trennleistung der Platte erheblichen Einfluß. Eine Klimakammer bietet die besten Voraussetzungen für konstante Außenbedingungen.
Die Dünnschichtchromatographie wurde von uns bei einer Temperatur von 37 ^{o}C und einer Luftfeuchtigkeit von 33% durchgeführt. Für eine gute Trennung von zwei Metaboliten müssen sich die R_F-Werte um 0,08 - 0,1 unterscheiden. Tabelle 6 zeigt die R_F-Werte für die einzelnen Metaboliten des Digitoxins in zwei verschiedenen Fließmitteln. Beide Fließmittelsysteme ergänzen sich in der Trennleistung. Das Fließmittelsystem 1 (s. 3.2.1.) trennt vornehmlich die hydroxylierten von den nichthydroxylierten Metaboliten des Digitoxins und auch das Digitoxin vom Digitoxigenin-bisdigitoxosid, Digitoxigeninmonodigitoxosid und Digitoxigenin. Die 12-ß-hydroxylierten Metaboliten des Digitoxins werden dagegen mit Ausnahme des Digoxigenins nur unzureichend getrennt. Im Fließmittelsystem 2 (s. 3.2.1.) werden sowohl die nichthydroxylierten wie auch die hydroxylierten Metaboliten des Digitoxins gut getrennt. Allerdings überlappen sich beide Gruppen.
In Tabelle 7 sind diejenigen Laufmittelsysteme aufgeführt, die zum Studium des Metabolismus von Digoxin von uns angewandt wurden.

Als Referenzsubstanzen dienten folgende Metaboliten des Digitoxins und Digoxins (Fa. Boehringer, Mannheim:

Digitoxin (DT3), Digitoxigeninbisdigitoxosid (DT2), Digitoxigeninmonodigitoxosid (DT1), Digitoxigenin (DTO), 3 epi-digitoxigenin (3 epi DTO), Dihydrodigitoxin

Abb. 2o: Dünnschichtchromatogramm von Digitoxin und seinen Metaboliten (Fließmittelsystem 1).

RF Werte für verschiedene Metaboliten des Digitoxins und Digoxins

Substanz	Aethylmethylketon/Xylol[+] 50/50	Aethylacetat/Chloroform/Eisessig[++] 90/5/5
Digitoxin	0,42	0,53
Digitoxigenin - bis - digitoxosid	0,50	0,74
Digitoxigenin - mono - digitoxosid	0,57	0,85
Digitoxigenin	0,70	0,93
3 epi - digitoxigenin	0,64	0,89
Digoxin	0,17	0,31
Digoxigenin - bis - digitoxosid	0,22	0,46
Digoxigenin - mono - digitoxosid	0,26	0,66
Digoxigenin	0,34	0,71

+ TLC auf Kieselgel GF_{254} Platten, die mit 12% Formamid/Azeton imprägniert sind, zweimalige Entwicklung

++ TLC auf Kieselgel GF_{254} Platten, einmalige Entwicklung

Tab. 6

RF Werte für Digoxin, H_2 - Digoxin und Metaboliten.

Substanz	Aethylacetat / Chloroform / Essigsäure[+] 90/5/5	Chloroform / Aceton[+] 65/35	Chloroform / MeOH / H_2O[++] 95/5/0,25
Digoxin	0,39	0,28	0,23, keine Trennung
Dihydrodigoxin	0,40	0,28	
Digoxigenin - bis - digitoxosid	0,51	0,36	
Digoxigenin - mono - digitoxosid	0,67	0,48	
Digoxigenin	0,72	0,59	0,66
Dihydro - digoxigenin	0,73	0,61	0,77
3 epi - digoxigenin	0,60	0,48	0,58

\+ Zweimalige Entwicklung auf Kieselgel G Platten

++ Einmalige Entwicklung auf aktivierten Aluminiumoxid G Platten (90 Minuten, 110^0 C)

Tab. 7:

(H_2-DT3), Digoxin (DG3), Digoxigeninbisdigitoxosid (DG2), Digoxigeninmonodigitoxosid (DG1), Digoxigenin (DGO), Dihydrodigoxin (H_2-DG3).

Die Referenzsubstanzen wurden in einer Konzentration von 1o - 2o µg/5o µl auf Platten mit Fluoreszenzindikator aufgetragen. Die Sichtbarmachung erfolgte nach Auftrennung unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm bzw. nach Erhitzen auf 11o ^{o}C für 1o Minuten und Ansprühen mit 5o% H_2SO_4/Methanol.

Das Problem der unterschiedlichen Laufstrecken von Standard und Extrakt wurde durch die Technik der Co-chromatographie gelöst, während die Beseitigung von Chromogenen eine aufwendige Extraktionstechnik verlangte (Verfahren nach Eidus, Ling und Hernanansingh, 1969).

3.12.4. Extraktionsverfahren zur Reinigung von Metaboliten des Digitoxins im Urin (modifiziert nach L.Storstein 1976, Eidus, Ling und Harnanansingh 1969)

Urinprobe

↓

3 x Extraktion mit dem 3fachen Volumen an Dichlormethan ← wasserlösliche Metaboliten

↓

Extrakt eindampfen

↓

lösen in 7o% Alkohol

Entfernung stark lipophiler Substanzen

+ Petrolaether → verwerfen (Siedebereich: 4o - 6o °C)

↓

Alkoholphase eindampfen

↓

Extrakt lösen in

Dichlormethan } 1 : 1
Aether }

↓

Entfernung von Chromogenen

Zugabe von

$\frac{n}{1o}$ Na OH → verwerfen

↓

Dichlormethan } Phase 2x mit H_2O bidest. waschen, dann eindampfen
Aether }

↓

5o µl gelöster Extrakt (Dichlormethan/Methanol 1 : 1) zur DC auftragen

Aliquot im Flüssigkeitsszintillationszähler messen

3.13. Gaschromatographie (GC-EC), als Verfahren zum Studium des Metabolismus der nichthydrierten und dihydrierten Metaboliten von Digoxin
(Watson und Kalman 1971, Clark und Kalman 1974)

1971 beschrieben Watson und Kalman erstmalig einen brauchbaren Assay zur Bestimmung von Digoxin im Plasma und Urin mit Hilfe der Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor. Zur Bestimmung von Digoxin wurden etwa 1o ml Plasma oder 2 ml Urin benötigt. Später wurde das Verfahren auch von Clark und Kalman (1974) zum Studium der Metaboliten des Digoxins angewandt. Dazu war eine zusätzliche chromatographische Trennung der hydrolytischen Metaboliten des Digoxins in verschiedenen Laufmittelsystemen notwendig. Bei unserem Studium zum Metabolismus von Digoxin haben wir die Trennung der hydrolytischen Metaboliten mit den in Tabelle 7 aufgeführten Laufmittelsystemen durchgeführt, die sich gut ergänzen.
Die isolierten Metaboliten des Digoxins werden mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) an den OH Gruppen des Steroidkerns (C_3 und C_{12} beim Digoxigenin) derivatisiert, nachdem durch die freigesetzte Buttersäure eine Säureglykolyse stattfand. Die halogenierten Derivate sind Genine. Sie lassen sich mit dem Gaschromatographen mit Elektroneneinfangdetektor (^{63}Ni Detektor) unter bestimmten Bedingungen nach hydrierten und nichthydrierten bzw. 3-epi Metaboliten des Digoxins auftrennen. Je nach Säulenbeschickung (OV 17 oder OV 1o1) werden Digoxigenin HFB, Dihydrodigoxigenin HFB, Digitoxigenin HFB und 3 epi-digoxigenin voneinander gut getrennt (Tab. 8). Mit beiden Säulen ist eine eindeutige Identifizierung dieser Metabolitengruppen möglich.

Als Gaschromatograph wurde das Gerät Tracor MT 22o mit

Retentionszeiten auf zwei verschiedenen Gaschromatographiesäulen (Minuten)

Substanz	OV 17[+]	OV 101[++]
DG-O HFB_2	11,5	13,8
H_2DG-O HFB_2	10,0	11,8
3 epi-DG-O HFB_2	10,9	11,8
DTG-O HFB	24,0	17,0

\+ 3% OV 17 auf 100/120 mesh gas chrom Q, 3' x 2mm ID Säule, Heizofentemperatur = 235°, He ≃ 60-80 ml/min.

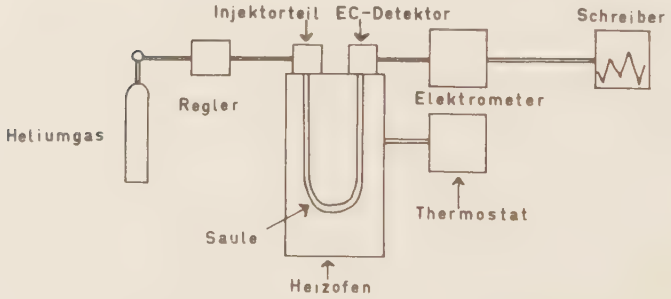
++ 3% OV 101 auf 100/120 mesh gas chrom Q, 5' x 2mm ID Säule, Heizofentemperatur = 235°, He ≃ 60-80 ml/min.

Tracor MT 220 mit 14,5 mCi ^{63}Ni Elektroneneinfangdetektor.

Detektor: T = 325°.

Tab. 8

einem 14,5 mCi ^{63}Nickel Elektroneneinfangdetektor benutzt. Die Glassäulen waren U-förmig gestaltet und hatten eine Länge von 183 cm mit einem Innendurchmesser von 2 mm. Die Beschickung bestand aus einer Mischung von 3% OV 101 oder OV 17 - einem Methylsilikon- bzw. einem substituierten Silikonpolymer und 100/120 mesh Gas Chrom Q, einer Erdalkalisubstanz als solide Phase (Applied Science Laboratories, State College, Pa.). Als Trägergas wurde Helium benutzt. Die Flußrate betrug 55 ml/Minute. Als günstigste Bedingungen wurden folgende Arbeitstemperaturen gewählt:
im Injektorteil 265 °C, in der Säule 245 °C und im Detektor 330 °C.



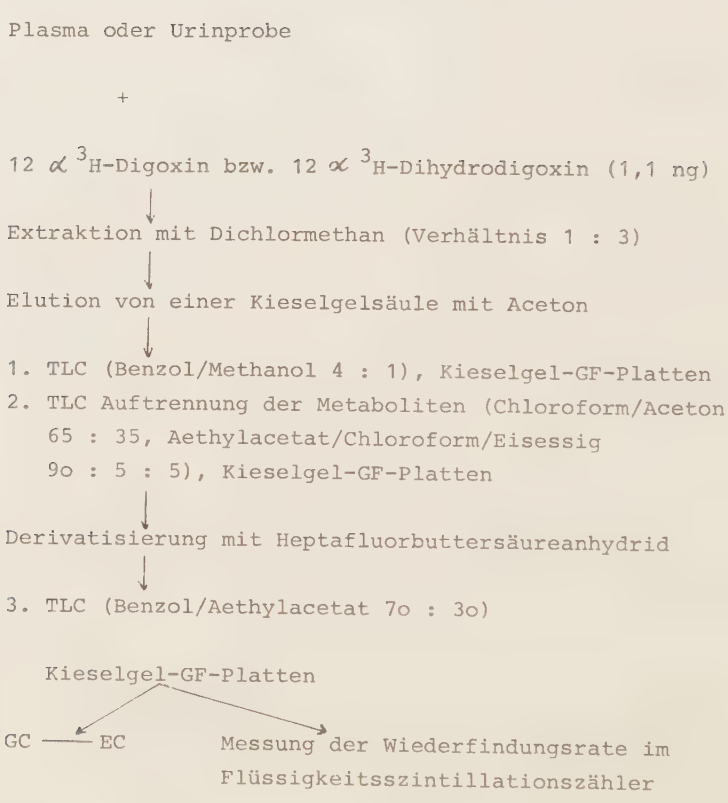
Im einzelnen wird bei der Bestimmung folgendermaßen vorgegangen:
zu einer Probe wird zur Berechnung der Wiederfindungsrate 12 α ^{3}H-Digoxin oder 12 α ^{3}H-Dihydrodigoxin (1,1 ng) zugesetzt. Es folgt die Extraktion mit Dichlormethan. Der Extrakt wird auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und eluiert und anschließend mit Hilfe der

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-GF-Platten von Begleitsubstanzen gereinigt. Als Referenzsubstanz dient hierbei Orcein, aus einer Farbstoffgruppe, die in den R_F-Werten mit dem Digoxin und seinen Metaboliten bei dem gewählten Laufmittelsystem (Benzol/Methanol 8o : 2o) übereinstimmt. Die Auftrennung der einzelnen hydrolytischen Metaboliten erfolgt in den zwei angegebenen Fließmitteln. Anschließend wird mit Heptafluorbuttersäureanhydrid ein hitzestabiles Derivat des Metaboliten hergestellt. Es handelt sich hierbei um 3, 12 -Diheptafluorbuttersäure-digoxigenin oder Diheptafluorbuttersäuredihydrodigoxigenin. Das Derivat wird von unspezifischen Reaktionsprodukten durch einen weiteren dünnschichtchromatographischen Schritt getrennt (Laufmittelsystem = Chloroform/Aceton 65 : 35) und nach Extraktion mit Aceton in den Gas-chromatographen injiziert. Ein Teil der Probe wird zur Berechnung der Wiederfindungsrate (^{3}H-Aktivität) im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Als interner Standard wird Digitoxigenin-HFB verwandt.
Die Messung erfolgt durch Vergleich des Quotienten

$$\frac{\text{Peakhöhe Digoxigenin-HFB bzw. Dihydrodigoxigenin HFB (Standard oder Probe)}}{\text{Peakhöhe Digitoxigenin-HFB}}$$

der Probe mit einem Standard, dessen Konzentration bekannt ist.
Die kleinste nachweisbare Digoxinmenge liegt bei 2oo pg und die Wiederfindungsrate beträgt im Mittel 25%.

Schema:


Plasma oder Urinprobe
+
12 ∝ 3H-Digoxin bzw. 12 ∝ 3H-Dihydrodigoxin (1,1 ng)
Extraktion mit Dichlormethan (Verhältnis 1 : 3)
Elution von einer Kieselgelsäule mit Aceton
1. TLC (Benzol/Methanol 4 : 1), Kieselgel-GF-Platten
2. TLC Auftrennung der Metaboliten (Chloroform/Aceton
65 : 35, Aethylacetat/Chloroform/Eisessig
9o : 5 : 5), Kieselgel-GF-Platten
Derivatisierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid
3. TLC (Benzol/Aethylacetat 7o : 3o)
Kieselgel-GF-Platten
GC
EC
Messung der Wiederfindungsrate im
Flüssigkeitsszintillationszähler

3.14. Nichtinvasive Messung der systolischen Zeitintervalle und der Änderung der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskuve

Die Wirkung von Digitalis auf die Dynamik des Herzens wurde mit Hilfe der systolischen Zeitintervalle durch simultane Registrierung von Elektrokardiogramm, Phonokardiogramm und Carotispulskurve (Abb. 21) und der Änderung der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve (1. Differentialquotient: max dC/dt %, Gerät Teko Mod. CH/2, Fa. Siemens) bestimmt . Anspannungszeit (PEP), Austreibungszeit (LVET) und Systolendauer (QS_2 bzw. QA_2) wurden in Anlehnung an die Angaben von Blumberger (194o) ermittelt und eine Frequenzkorrektur nach der von Weissler et al. (1961, 1965) angegebenen Formel durchgeführt:

$$\text{frequenzkorrigiertes Zeitintervall} = \frac{\text{gemessenes Zeitintervall}}{\sqrt{\text{RR Abstand}}}$$

Die Messung erfolgte nach intravenöser Gabe von 0,75 mg Digitoxin im Abstand von 1, 2, 4 und 8 Stunden, wobei jeweils vor der Messung eine Ruheperiode von 15 Minuten eingehalten wurde. Für die Registrierung wurde ein 6 Kanalschreiber (Cardirex 6-T, Siemens) verwandt. Die Auswertung von Phonokardiogramm und Carotispulskurve wurde an jeweils 1o Herzaktionen durchgeführt. Die Änderung der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve (Δ max dC/dt) wurde in eine geeichte Amplitudenänderung umgewandelt und quantitativ meßbar. Die Registriergeschwindigkeit betrug 1oo mm/sec.

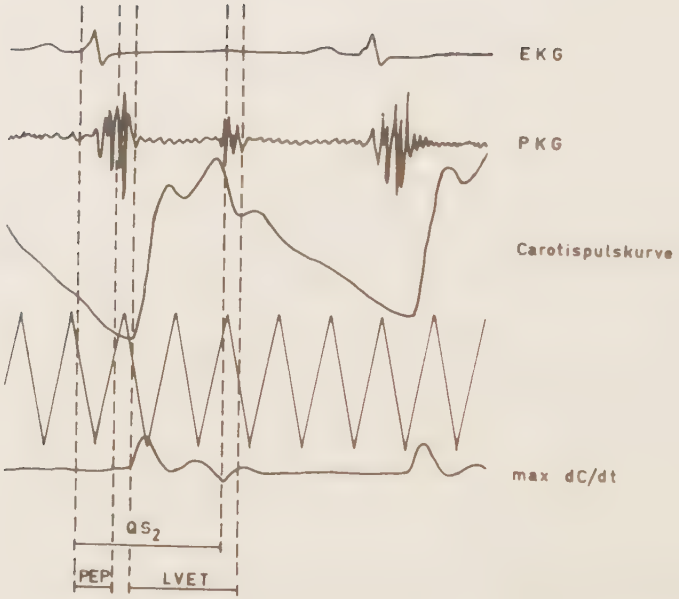


Abb. 21: Simultane Registrierung von Elektrokardiogramm, Phonokardiogramm, Carotispulskurve und maximaler Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve (max dC/dt).
Registriergeschwindigkeit: 1oo mm/sec

3.15. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurden die Einzelwerte, die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen der Einzelwerte (s) und Mittelwerte (SEM) zugrunde gelegt. Die Standardabweichung der Einzelwerte als % des Mittelwertes ergab den Variationskoeffizienten (VK).

Die Signifikanzprüfung wurde mit Hilfe des verteilungsfreien Wilcoxon-Testes für Paardifferenzen vorgenommen, wobei eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 5\%$ zugelassen wurde.

Zum Vergleich der Ergebnisse zweier Grundgesamtheiten wurde der Student-t-Test herangezogen (s. Kapitel 5.1.1.). Bei $(N_1 + N_2 - 2)$ Freiheitsgraden wird aus den Mittelwerten $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$, den Varianzen s_1^2 und s_2^2 von zwei unverbundenen Stichproben vom Umfang N_1 bzw. N_2 die Größe T nach folgender Gleichung berechnet:

$$T = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1)\, s_1^2 + (N_2 - 1)\, s_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \cdot \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als $p = 5\%$ betrug. Die Signifikanzschranken war den Geigy Tabellen (1960) entnommen.

Der Korrelationskoeffizient (r) von N Wertepaaren (x, y) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$r = \frac{\sum xy - N \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{(\sum x^2 - N \bar{x}^2)(\sum y^2 - N \bar{y}^2)}}$$

4. Patienten

Serumdigitoxinspiegel wurden bei 448 stationären Patienten radioimmunologisch gemessen. Für die Vergleichsstudien der Serumdigitoxinspiegel bei verschiedenen Krankheitsgruppen waren die Patienten mit Digitoxin länger als 3o Tage behandelt worden. Bei ihnen konnte ein Steady-state Serumspiegel angenommen werden, der sich bei konstanten Absorptions- und Eliminationsraten und einem Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und Gewebe einstellt.

Folgende Voraussetzungen waren erfüllt:

1. Regelmäßige, perorale Einnahme der verordneten Digitalisdosis (Dosierungsintervall: 24h).
2. Keine Dosisänderung während der Erhaltungstherapie.
3. Blutabnahmen morgens nüchtern vor der morgendlichen Digitoxineinnahme.

Das Krankengut der Vergleichsstudien gliederte sich in folgende Gruppen auf:

59 Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz
76 Patienten mit Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz
9 Patienten mit Leberzirrhose

Das mittlere Alter in diesen Patientengruppen betrug 59,5 $\pm$ 12,9 Jahre, 48,4 $\pm$ 14,1 Jahre und 54,1 $\pm$ 15,5 Jahre. Die Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz waren verschiedenen Stadien zuzuordnen:

1. Stabile bzw. instabil kompensierte Niereninsuffizienz (Kreatininclearance: $<$ 1o - 5o ml/min).

2. Terminale Niereninsuffizienz im Dialysestadium (Kreatininclearance: < 1o ml/min)
3. Chronische Niereninsuffizienz mit nephrotischem Syndrom (Kreatininclearance: < 3o ml/min).

Die Diagnose der Leberzirrhose wurde laparaskopisch und bioptisch gesichert. Die klinischen Angaben sind aus Tab. 18 ersichtlich. Alle Patienten erhielten Digitoxintabletten (Fa. Merck, Darmstadt). Sie entsprachen nach Glykosidgehalt und Wirkmittelfreisetzungsgeschwindigkeit den nach USP XIX festgelegten Richtlinien.

Für die Absorptionsstudien von Digitoxin wurden Digitoxintabletten der Chargennummer: D - 3369083 verwandt, mittlerer Wirkstoffgehalt: 1o3,5 µg/Tabl. VK = 2,7%. Freisetzung des Wirkstoffes aus der Tablette in künstlichem Magensaft (nach DAB7): nach 3o Minuten 9o%
nach 6o Minuten 95 - 1oo%
(Schwarze und Hittinger 1974).

Das kristallisierbare Digitoxin hatte einen Gehalt (nach USP XIX) von 98%, davon 95% als Trisglykoside und 3% als Bisglykoside. Gitoxigeninglykosidanteil etwa 1%, Schmelzpunkt 255 °C (Angaben der Fa. Merck, Darmstadt).

Die Vollwirkdosis für Digitoxin betrug für alle Patientengruppen 1,o - 1,5 mg und die perorale Erhaltungsdosis O,1 mg Digitoxin/die (Digimerck^{R} Tabl.). Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und einzelne Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz erhielten als weitere Medikamente: Antihypertensiva (Propranolol, Reserpin, Clonidin, Dihydralazin, α-Methyldopa), Furosemid und Aludrox^{R} (kolloidales Aluminiumhydroxid). Die Dialysepatienten wurden dreimal pro Woche 6 - 10 Stunden hämodialysiert (Spule EX 21, Platte Gambro lundia optima,

Kapillardialysator Dow Cordis C-DAK4).

11 Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz und 6 Patienten mit Leberzirrhose erhielten zusätzlich Spironolacton in einer peroralen Dosierung von 1oo - 2oo mg/die.

Absorptionsstudien von Digitoxin aus dem Gastrointestinaltrakt wurden bei 5 Probanden und 5 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 5,5 - 12,8 mg%) durchgeführt. Der Einfluß von kolloidalem Aluminiumhydroxid auf die enterale Absorption von Digitoxin wurde bei 3 Probanden im intraindividuellen Versuch überprüft. Die gastrale Absorption von Digitoxin wurde bei 5 Patienten unter gastroendoskopischer Kontrolle untersucht. Dazu wurden 2 ml einer Digitoxinlösung (0,5 mg Digitoxin) über ein Gastroskop (Panendoskop ACM F8) und einen Polyaethylenkatheter auf die Magenschleimhaut des Corpus ventriculi appliziert. Die Stelle der Resorption wurde durch Zugabe von Methylenblau markiert. Durch Lagerung des Patienten auf die linke Körperseite konnte sichtbar verhindert werden, daß das Digitoxin in das Duodenum gelangte.

Die Bestimmung des freien Digitoxins im Serum und der Eiweißbindung von Digitoxin erfolgte bei 14 Patienten mit Herzinsuffizienz, 13 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und 9 Patienten mit Leberzirrhose.

Eine Korrelationsstudie zwischen Digitoxinkonzentration im Serum, freiem Serumdigitoxin und Digitoxinkonzentration im Speichel wurde bei 6 Patienten (Herzinsuffizienz n = 4 und Niereninsuffizienz n = 2) durchgeführt.

Die Serumhalbwertzeit von Digitoxin wurde bei 8 Probanden (Alter: 32 $\pm$ 5,2 Jahre), 6 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Alter: 41,7 $\pm$ 14,2 Jahre) und

6 Patienten mit Leberzirrhose (Alter: 48,3 ± 14,9 Jahre) durch lineare Regression der Digitoxinkonzentration-Zeit-Kurve im halblogarithmischen Koordinatensystem ermittelt.

Studien zum Metabolismus von Digitoxin wurden bei 7 Patienten mit Herzinsuffizienz (Alter: 59,9 ± 9,8 Jahre) und 3 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Alter: 56,7 ± 3,3 Jahre) mit ^{3}H-Digitoxin (s. Kapitel 3.12.1.) durchgeführt.

Der Einfluß von Digitoxin auf die frequenzkorrigierten, nichtinvasiven systolischen Zeitintervalle (PEPI, LVETI, PEP/LVET) und die maximale systolische Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve (erster Differentialquotient, Δ max. dC/dt%) wurde bei 6 gesunden Probanden und 7 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 7,7 ± 3,2 mg%) untersucht. Davon waren 3 Patienten im Stadium der dekompensierten Retention. Zur Zeit der Untersuchung war eine Dialysetherapie noch nicht durchgeführt worden. Die Kaliumkonzentrationen im Serum betrugen bei den 7 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 4,3 - 5,3 mval/l und bei den Probanden 3,8 - 5,1 mval/l (Einzelheiten s. Tab. 17).

Radioimmunologische Serumdigoxinbestimmungen wurden bei 1oo stationären Patienten (Department of Pharmacology, Medical School, University Stanford, USA) durchgeführt. Alle Patienten wurden mit dem gleichen Digoxinpräparat (Lanoxin^{R} - Burroughs Wellcome) behandelt.

Folgende Patientengruppen erhielten länger als 1o Tage eine konstante perorale Dosis von 0,125 bzw. 0,25 mg Digoxin/die:

41 Patienten mit Herzinsuffizienz
1o Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

7 Patienten mit den Zeichen einer Digoxinintoxikation erhielten eine höhere Erhaltungsdosis als 0,25 mg Digoxin/die.

Studien zum Metabolismus von Digoxin wurden bei 1oo Patienten im Urin mit Hilfe der Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Bei einer Patientin konnte zusätzlich auch im Serum der Metabolismus von Digoxin analysiert werden.

5. Ergebnisse

5.1. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei gesunden Probanden und Patienten mit Herzinsuffizienz

5.1.1. Häufigkeitsverteilung der Serumdigitoxinspiegel in einem unausgewählten und ausgewählten Krankengut

Bei einem nach Digitoxindosis und Krankheiten nicht aufgeteilten Patientengut, das mit Digitoxin behandelt wurde, fanden wir bei 448 Patienten (März 1976 - September 1977) einen mittleren Serumdigitoxinspiegel von 24,1 $\pm$ 11,9 ng/ml. Die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte ähnelt einer Normalverteilung (Abb. 22). Bei 1o% dieser Patienten lag der Serumdigitoxinspiegel unter 1o,o ng/ml und bei 9,6% über 4o,o ng/ml. Der höchste Wert wurde mit 77,1 ng/ml gemessen. Bei einem nach Dosierung und Krankheit (Herzinsuffizienz mit und ohne chronische Niereninsuffizienz) getrennten Krankengut scheinen die gemessenen Serumdigitoxinspiegel ebenfalls normal verteilt (Abb. 23).

5.1.2. Serumdigitoxinspiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz

Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz, die Steady-state Bedingungen bezüglich des Serumdigitoxinspiegels erfüllten, betrug der mittlere Serumdigitoxinspiegel unter einer Erhaltungsdosis von O,1 mg Digitoxin/die 26,5 $\pm$ 7,3 ng/ml (n = 29) und bei einer Erhaltungsdosis von O,143 mg/die (entsprechend 1,o mg/Woche bei Mittwoch/Sonntag-Pause der Tabletteneinnahme) 33,5 $\pm$ 5,5 ng/ml (n = 27). Einzelheiten s. Tab. 9.

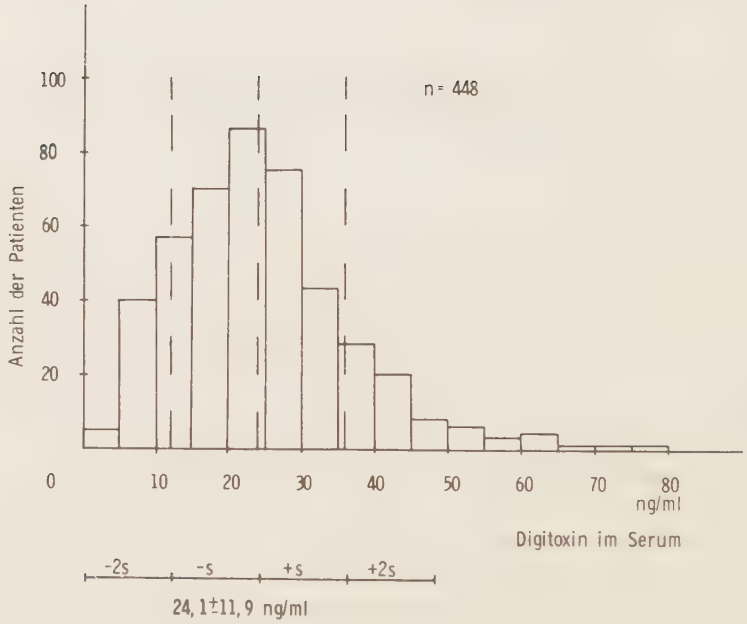


Abb. 22: Häufigkeitsverteilung der Serumdigitoxinspiegel bei einem unausgewählten Krankengut.

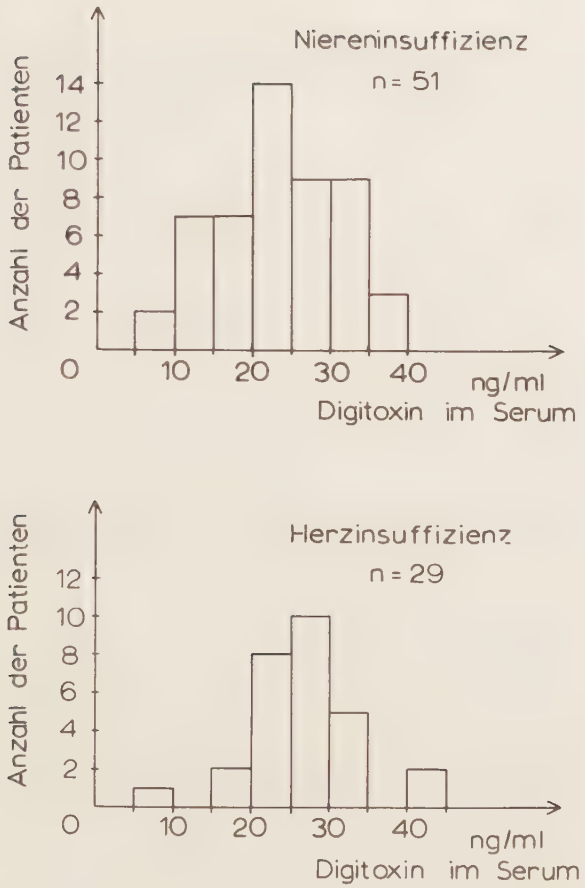


Abb. 23: Häufigkeitsverteilung der Serumdigitoxinspiegel bei einem ausgewählten Krankengut.

Patienten n	Dosis (mg/d)	Serumdigitoxin+ (ng/ml)	p
29	0,1	26,5 ± 7,3	< 0,0005
27	0,143	33,5 ± 5,5	

+ Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Tab. 9: Digitoxinkonzentration im Serum bei Patienten mit Herzinsuffizienz unter verschiedenen Erhaltungsdosen.

5.1.3. Eiweißbindung von Digitoxin und Konzentration des eiweißungebundenen Digitoxins bei Patienten mit Herzinsuffizienz

Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz (n = 14) fanden wir eine Eiweißbindung für Digitoxin von 96,2 $\pm$ 1,3% (Bereich: 93,4 - 97,9%, Tab. 1o). Die mittlere Serumdigitoxinkonzentration lag bei 22,8 $\pm$ 8,6 ng/ml. Die Einzelwerte schwankten zwischen 9,1 - 45,o ng/ml. Die freie Digitoxinkonzentration im Serum betrug O,8 $\pm$ O,3 (O,6 - 1,5) ng/ml (Abb. 24).

5.1.4. Vergleich von Serumdigitoxinspiegel, eiweißungebundenem Digitoxin im Serum und Digitoxinkonzentration im Speichel

Bei 6 Patienten wurde unter einer Erhaltungsdosis von O,1 mg/die Digitoxin der Serumdigitoxinspiegel, das freie Digitoxin im Serum und die Digitoxinkonzentration im Speichel radioimmunologisch bestimmt. Der Speichel wurde nach Anregung der Speichelsekretion durch Kaubewegungen (Kaugummi) gewonnen. Die letzte Digitoxineinnahme erfolgte 24 Stunden vor den Probeentnahmen. Die Konzentrationen des Digitoxins im Serum lagen bei diesen Patienten zwischen 9,1 und 21,o ng/ml und im Speichel zwischen 2,o und 3,8 ng/ml. Die Konzentration im Speichel entsprach 12,1 - 31,9% der Serumdigitoxinkonzentration. Die Konzentration des freien Digitoxins im Serum betrug O,8 - 1,2 ng/ml und entsprach 4,6 - 11,6% der Serumdigitoxinkonzentration.

Es bestand keine nachweisbare Beziehung zwischen der Speichelkonzentration des Digitoxins und der Konzentration des freien Digitoxins im Serum oder dem Serumdigitoxinspiegel (Abb. 25).

Patienten	Serumdigitoxin+ (ng / ml)	ungebundenes Digitoxin + (ng / ml)	Eiweißbindung von Digitoxin+ (%)	Eiweißbindung von ^{3}H-Digitoxin+ (%)
Leberzirrhose (n = 9)	18,4 ± 3,1	1,5 ± 0,7	91,9 ± 4,1	92,2 ± 5,2
Herzinsuffizienz (n = 14)	22,8 ± 8,6	0,8 ± 0,3	96,2 ± 1,3	95,6 ± 1,3
	$p > 0,05$	$p < 0,0025$	$p < 0,0025$	$p < 0,025$

+ Mittelwert und Standardabweichung

Tab. 1o: Eiweißbindung von Digitoxin und eiweißungebundene Digitoxinkonzentration im Serum bei Patienten mit Herzinsuffizienz und Patienten mit Leberzirrhose.

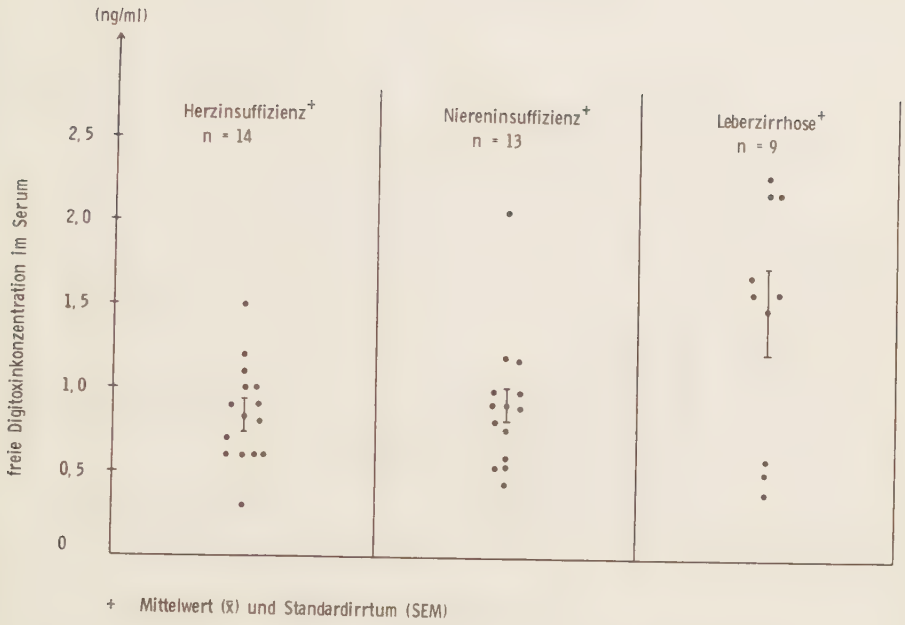


Abb. 24: Eiweißungebundene Digitoxinkonzentration im Serum bei Patienten mit Herzinsuffizienz, chronischer Niereninsuffizienz und Leberzirrhose unter einer peroralen Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die.

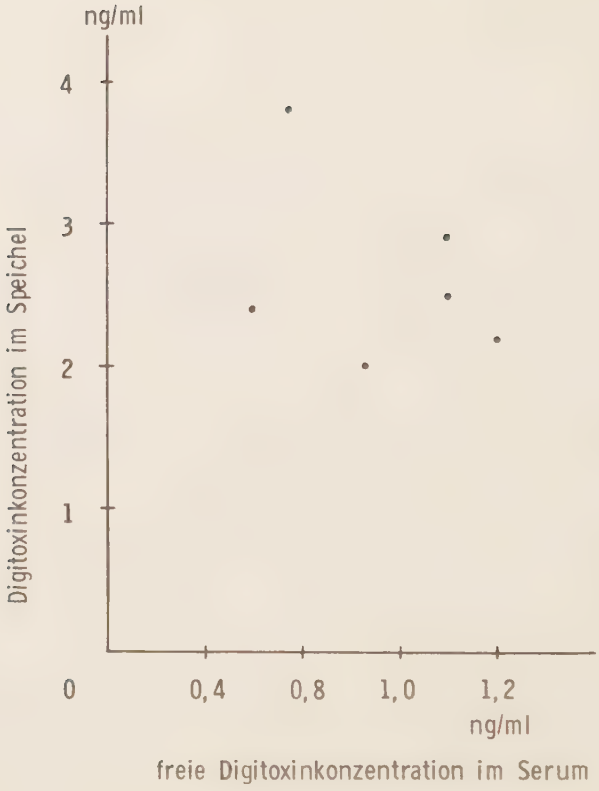


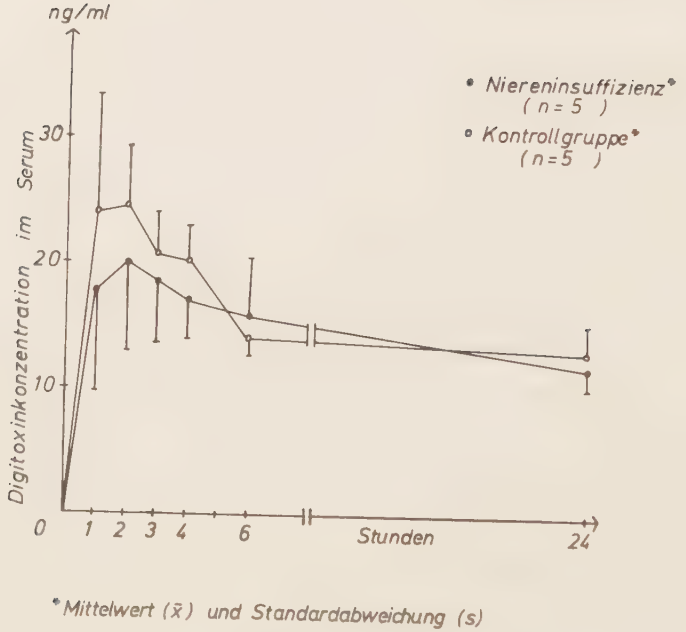
Abb. 25: Abhängigkeit der Digitoxinkonzentration im Speichel von der freien Digitoxinkonzentration im Serum.

5.1.5. Absorption von Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei gesunden Probanden

Bei gesunden, nüchternen Probanden (n = 5) weist der zeitabhängige Verlauf der Digitoxinkonzentration im Serum nach peroraler Einnahme von 0,5 mg Digitoxin (Tabl.) auf eine schnell einsetzende Digitoxinabsorption im Gastrointestinaltrakt hin. Bereits 1o Minuten nach der Einnahme konnten Serumdigitoxinspiegel gemessen werden (Abb. 26). Das Maximum des Serumdigitoxinspiegels wurde mit 24,5 $\pm$ 4,8 ng/ml nach 2 Stunden erreicht. Die Absorptions- und Verteilungsphase waren nach 6 Stunden abgeschlossen. Hieran schloß sich das Pseudoäquilibrium an. Nach 24 Stunden betrug die Serumkonzentration 13,1 $\pm$ 2,3 ng/ml und die Fläche unter der 24-h-Absorptionskurve 72,8 $\pm$ 12,9 Flächeneinheiten (ng/ml x Std.). Die Variationskoeffizienten für die Einzelkonzentrationen nahmen von 4o,8% nach 1 Stunde auf 17,6% nach 24 Stunden ab.

5.1.5.1. Absorption von Digitoxin im Magen

Die Absorptionskurven bei ausschließlicher intragastraler Applikation von Digitoxin (Lsg) zeigt, daß Digitoxin von der Magenschleimhaut absorbiert wird (Abb. 27). Allerdings ist die Absorptionsrate großen individuellen Schwankungen unterworfen. Bei zwei Patienten (4 und 5) bestand im Vergleich zu den drei anderen Patienten nur eine geringe Absorptionsrate.
Unabhängig von der Absorptionsrate zeigte sich bei allen Patienten ein meßbarer Serumdigitoxinspiegel zum gleichen Zeitpunkt nach 1o Minuten.



*Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Abb. 26: Absorptionskurven von Digitoxin nach peroraler Einnahme von 0,5 mg Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Probanden.

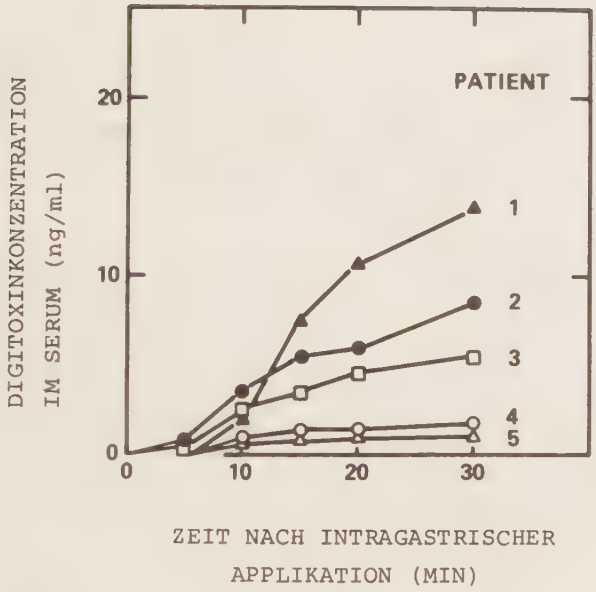


Abb. 27: Absorptionskurven von Digitoxin nach intragastraler Applikation von 0,5 mg Digitoxinlösung.

5.1.5.2. Absorption von Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei zusätzlicher Gabe von kolloidalem Aluminiumhydroxid (Aludrox^{R})

Zunächst wurde bei in-vitro Vorversuchen die Adsorption von ^{3}H-Digitoxinlösung an kolloidales Aluminiumhydroxid überprüft. Bei Konzentrationen des Aluminiumhydroxids von 5,o - 4o,o mg/ml wurde 55 - 98% des zugesetzten ^{3}H-Digitoxins (7 µg ≙ 1oo µCi) adsorbiert.

Bei 3 gesunden Probanden wurden dann im intraindividuellen Versuch Untersuchungen zur Absorption von Digitoxin Tabletten mit und ohne gleichzeitige Gabe von kolloidalem Aluminiumhydroxid durchgeführt. Die Probanden erhielten nüchtern 5 Tabletten à O,1 mg Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.). Nach 6 - 8 Wochen, wenn im Serum kein Digitoxin mehr nachweisbar war, erhielten sie zunächst 4,4 g Aludrox^{R} und anschließend die gleiche perorale Dosis an Digitoxin wie im Vorversuch.

Nach 1, 2, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden wurden jeweils Serumdigitoxinspiegel bestimmt und die Flächen unter den Absorptionskurven mit und ohne Gabe von Aludrox^{R} miteinander verglichen. Die Unterschiede waren zu keiner Zeit signifikant (Abb. 28), $p > 0,25$ bis $> 0,45$). Bei einem Patienten ließ sich im Langzeitversuch keine Beeinflussung der Serumdigitoxinspiegel durch unterschiedliche Dosen an peroral verabreichten Aluminiumhydroxid nachweisen (Abb. 29).

5.1.6. Elimination von Digitoxin bei Probanden

Bei 8 gesunden Probanden wurde die Eliminationshalbwertzeit von Digitoxin im Serum bestimmt. Es wurde von Serumdigitoxinspiegel ausgegangen, bei denen unter einer mehr-

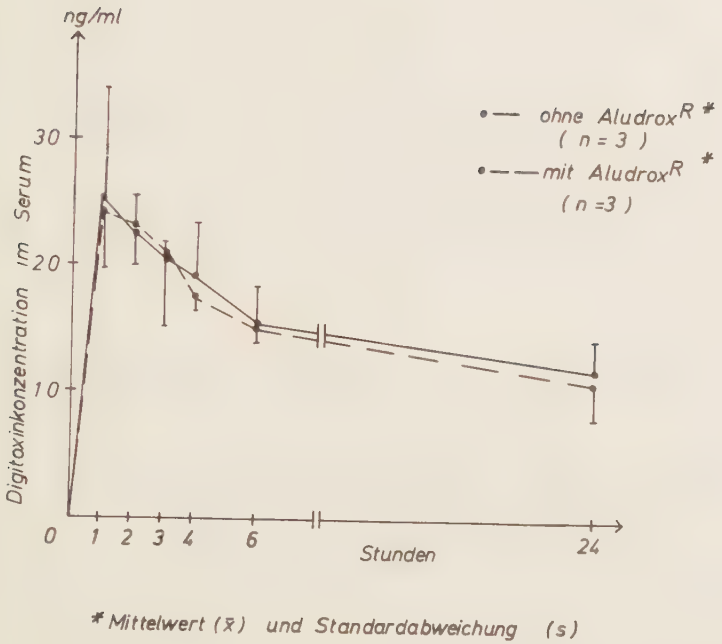


Abb. 28: Absorptionskurven von Digitoxin nach peroraler Einnahme von 0,5 mg Digitoxin (Digimerck^R Tabl.) mit und ohne Gabe von 4,4 g Aludrox^R bei Probanden.

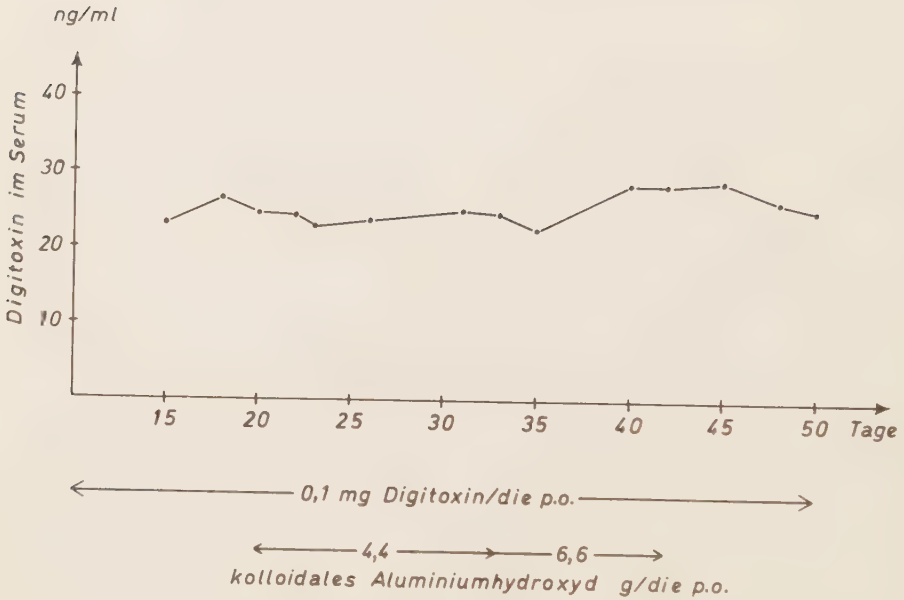


Abb. 29: Digitoxinkonzentration im Serum bei einem Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter einer Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die und verschiedenen Dosen von Aludrox^{R}.

wöchigen peroralen Dauertherapie von 0,1 mg Digitoxin/die Steady-state Bedingungen angenommen werden konnten. Nach Absetzen der Digitoxinmedikation wurden die Serumspiegel über einen Meßzeitraum von 8 - 1o Tagen gemessen. Die Serumhalbwertzeit von Digitoxin ergab sich aus der linearen Regression im halblogarithmischen Koordinatensystem. Als mittlere Serumhalbwertzeit wurde 7,6 $\pm$ 1,6 (4,8 - 9,3) Tage gemessen. Die mittlere, globale Eliminationskonstante k_e betrug 0,0956 $\pm$ 0,0316 $Tage^{-1}$. Der Korrelationskoeffizient für die Regressionsgeraden lag im Mittel bei 0,9895 $\pm$ 0,0173. Die extrapolierte Konzentration von Digitoxin zum Zeitpunkt t_o betrug c_o = 27,o ng/ml.

Demnach werden 9,6% der im Körper vorhandenen Gesamtmenge an Digitoxin pro Tag eliminiert (Tab. 11).

5.1.7. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei gesunden Probanden im Äquilibrium

Mittelt man die Ergebnisse der einzelnen Serumeliminationsgeraden für Digitoxin (halblogarithmisches Koordinatensystem) von 8 Probanden, so läßt sich eine durchschnittliche Eliminationsgerade festlegen (Abb. 3o). Der Schnittpunkt mit der y-Achse ergibt die mittlere Steady-state Serumdigitoxinkinzentration c_o zum Zeitpunkt t_o. Sie betrug bei Probanden unter einer mehrwöchigen peroralen Dauertherapie von 0,1 mg Digitoxin/die 27,o ng/ml. Aus dieser Konzentration läßt sich bei einem Körperpool für Digitoxin von 1,1 mg (Abb. 45) das mittlere fiktive Verteilungsvolumen im Steady-state ermitteln.

$$c_o \times V_d = M$$

$$V_d = \frac{M}{c_o} = \frac{11oo}{0,027} = 4o,7 \text{ l}$$

M = Glykosidmenge im Körper

V_d = fiktives Verteilungsvolumen

Das fiktive Verteilungsvolumen beträgt im Mittel für gesunde Probanden 4o,7 l und der Verteilungskoeffizient 0,59 l/kg (mittleres Körpergewicht: 69,o kg).

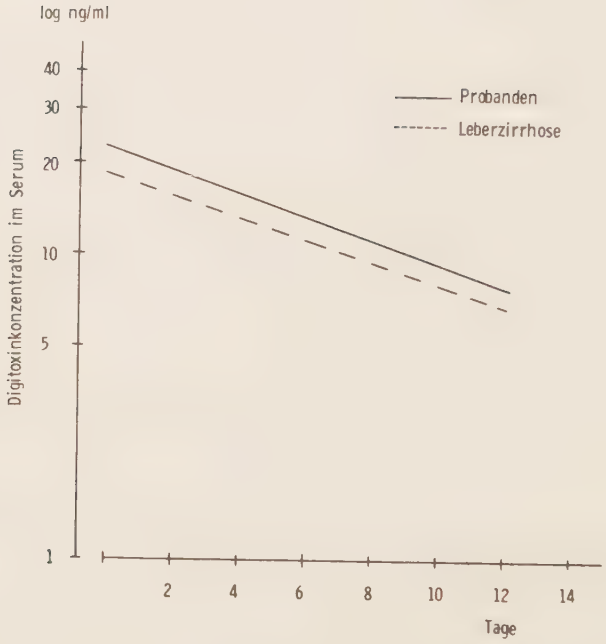


Abb. 3o: Mittlere Eliminationsgeraden von Digitoxin im Serum bei Probanden und Patienten mit Leberzirrhose nach Erreichen von Steady-state Bedingungen.

Abszisse: numerischer Maßstab
Ordinate: logarithmischer Maßstab

Serumhalbwertzeit von Digitoxin bei gesunden Probanden

	Digitoxineliminations-halbwertzeit im Serum[+] (Tage)	globale Eliminations-konstante[+] k_e
Probanden (n = 8)	7,6 ± 1,6	0,0962 ± 0,0223

[+] Mittelwert und Standardabweichung

Tab. 11

5.1.8. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Probanden im Pseudoäquilibrium

Bei 5 gesunden Probanden wurde das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium nach einer intravenösen Dosis von 0,5 mg Digitoxin bestimmt. Die Digitoxinkonzentration c_o wurde durch Extrapolation der terminalen Eliminationsgeraden (halblogarithmisches Koordinatensystem) auf die y-Achse ermittelt. Sie betrug zum Zeitpunkt t_o 15,6 $\pm$ 1,4 ng/ml (Abb. 31).

Verteilungsphase und Elimination verlaufen nach intravenöser Injektion im Sinne einer biexponentialen Funktion. Nach 4 Stunden ist die Verteilungsphase abgeschlossen (Abb. 36). Das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium wurde nach der Gleichung

$$V_d = \frac{M}{c_o}$$

berechnet (s. Kapitel 5.1.7.). Hierbei wurde als Körpermenge von Digitoxin 0,5 mg angenommen, da die Exkretion im Meßzeitraum vernachlässigt werden konnte.
Bei den Probanden betrug V_d = 32,3 $\pm$ 3,1 (29,4 - 37,3) l bzw. der Verteilungskoeffizient im Mittel 0,48 l/kg.

Abbildung 36 zeigt bei 6 Probanden die Verteilungskinetik nach intravenöser Injektion von 0,75 mg Digitoxin. Aufgrund von Gewicht und Hämatokrit (mittleres Körpergewicht: 67,o kg, Hk = 47%) wird für die Berechnung des Serumpools von Digitoxin ein Plasmavolumen von 2,7 l angenommen (Geigy Tabellen 196o). Nach 1 Stunde fanden sich unter Vernachlässigung der Exkretion 11,9%, nach 2 Stunden 9,4%, nach 4 Stunden 6,7% und nach 8 Stunden 5,5% der Dosis im Serum.

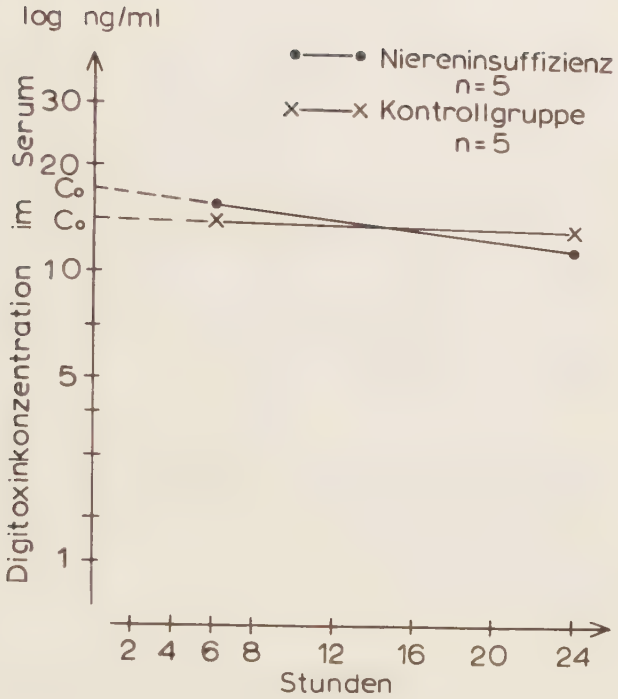


Abb. 31: Mittlere Eliminationsgeraden von Digitoxin im Serum bei Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nach einmaliger intravenöser Gabe von 0,5 mg Digitoxin.

Abszisse: numerischer Maßstab
Ordinate: logarithmischer Maßstab

5.1.9. Renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit Herzinsuffizienz

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz (n = 3) wurde die renale Exkretion (% der Dosis) von ^{3}H-Digitoxin nach intravenöser Injektion von 1oo µCi gemessen. Die Messung der ^{3}H-Aktivität erfolgte in einem Aliquot von 1 ml des 24-h-Urins mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers.
Es wurden innerhalb der ersten 24 Stunden 4,4 $\pm$ 0,56 (3,9 - 5,o) % des injizierten ^{3}H-Digitoxins als ^{3}H-Aktivität im Urin ausgeschieden. Während einer Sammelperiode von 7 Tagen wurde bei einem Patienten 21,2% der Dosis renal eliminiert (Tab. 15).

Bei 8 Patienten mit Herzinsuffizienz wurden unter Steady-state Bedingungen bei einer täglichen peroralen Erhaltungstherapie von O,1 mg Digitoxin 26,4 $\pm$ 11,o (16,5 - 44,8) % der Dosis als Digitoxin und immunreaktive Metaboliten im Urin ausgeschieden (Tab. 16).

5.2. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

5.2.1. Serumdigitoxinspiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurden bei einer Erhaltungsdosis von O,1 mg Digitoxin/die (n = 51) und O,143 mg Digitoxin/die (entsprechend 1,o mg Digitoxin/Woche bei Mittwoch/Sonntag-Pause der Tabletteneinnahme) (n = 22) Serumdigitoxinspiegel von 23,2 $\pm$ 7,8 ng/ml bzw. 29,9 $\pm$ 6,6 ng/ml gemessen (Tab. 12). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und nephrotischem Syndrom

Diagnose	Patienten n	Dosis (mg/d)	Serumdigitoxin (ng/ml)+	Gesamteiweiß (g/100ml)+	Serumalbumin (g/100ml)+	Serumkreatinin (mg/100ml)
Niereninsuffizienz	51	0,1	23,2±7,8 (6,7-37,4)++	6,3±0,9	3,4±0,7	1,6-16,0
Stadium der kompensierten Retention	21	0,1	23,0±6,4	6,4±1,0	3,2±0,8	6,6±4,7 (1,6-16,0)++
Dialysestadium	27	0,1	24,6±7,9	6,5±0,7	3,7±0,5	> 10,0
nephrotisches Syndrom	3	0,1	11,2±5,2	4,8±1,0	2,0±0,3	12,5/7,5/2,5
Niereninsuffizienz	22	0,14	29,9±6,6	6,2±0,8	3,1±0,6	6,6±3,5

\+ Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)
++ Bereich aller Einzelwerte

Tab. 12: Digitoxinkonzentration im Serum bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter verschiedenen Erhaltungsdosen.

(n = 3) wurden unter der gleichen Erhaltungstherapie mit 11,2 ± 5,2 ng/ml die niedrigsten Serumdigitoxinspiegel gemessen. Sie lagen um etwa 5o% niedriger als bei den bereits erwähnten Patientengruppen.
Intoxikationserscheinungen, die zu einer Änderung der Erhaltungsdosis hätten führen müssen, traten unter einer Dosis von 0,1 mg Digitoxin/die nicht auf. Sie wurden aber bei Einzelfällen beobachtet, bei denen die Dosis auf 0,15 mg/die erhöht wurde.

5.2.2. Eiweißbindung von Digitoxin und Konzentration des eiweißungebundenen Digitoxins bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n = 13), davon 5 im Dialysestadium und 8 im Stadium der kompensierten Retention, betrug die Eiweißbindung von Digitoxin 95,3 ± 1,8% (91,6 - 96,7%). Bei den 8 Patienten im Stadium der kompensierten Retention war sie auf 94,7 ± 2,0% signifikant erniedrigt ($p < 0,025$). Dagegen war die Eiweißbindung von Digitoxin bei Patienten im Dialysestadium (im dialysefreien Intervall) mit 96,2 ± 0,9% gegenüber Patienten mit Herzinsuffizienz nicht unterschiedlich. Bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz betrug die mittlere Digitoxinkonzentration im Serum 2o,o ± 6,3 ng/ml und die freie Digitoxinkonzentration im Serum 0,9 ± 0,4 (0,6o - 2,o7) ng/ml (Abb. 24). Sie war gegenüber Patienten mit Herzinsuffizienz nicht signifikant erhöht ($p > 0,15$).

Gesamteiweiß und Albumingehalt im Serum waren bei Patienten mit kompensierter Niereninsuffizienz erniedrigt, während sie bei Dialysepatienten gegenüber herzinsuffizienten Patienten nicht unterschiedlich waren (Tab. 13).

Diagnose	Patienten n	Eiweißbindung (%)+	Serumdigitoxin (ng/ml)+	freies Digitoxin (ng/ml)+	Gesamteiweiß (g/100ml)+	Serumalbumin (g/100ml)+	Serumkreatinin (mg/100ml)
Niereninsuffizienz	13	95,3±1,8	20,0±6,3	0,9±0,4	6,0±1,2	3,4±0,8	
Stadium der kompensierten Retention	8	94,7±2,0	18,4±0,5	1,0±0,5	5,8±1,4	3,1±1,0	12,4±5,0 (7,0-21,0)
Dialysestadium	5	96,2±0,9	22,5±5,8	0,9±0,3	6,4±0,3	3,7±0,2	> 10,0

+ Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Tab. 13: Eiweißbindung von Digitoxin und eiweißungebundene Digitoxinkonzentration im Serum bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Bei einem urämischen Patienten (Kreatinin im Serum: 21,o mg%) war trotz normaler Albuminkonzentration im Serum die Eiweißbindung von Digitoxin auf 91,6% erniedrigt. Die freie Digitoxinfraktion war mit 2,1 ng/ml deutlich erhöht.

5.2.3. Absorption von Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n = 5) wurden nach peroraler Einnahme von 0,5 mg Digitoxin (Digimerck^{R} Tabl.) Absorptionskurven erstellt. Sie zeigten beim Vergleich der Einzelwerte zu verschiedenen Zeiten und im Vergleich der Flächen unter den Absorptionskurven (ng/ml x Std.) über 24 Stunden gering niedrigere Werte gegenüber gesunden Probanden (n = 5). Der Unterschied war jedoch zu keiner Zeit signifikant ($p > 0,05 - 0,2$). Das Maximum des Serumspiegels wurde mit 2o,o $\pm$ 7,o ng/ml nach 2 Stunden erreicht. Der 24-Stundenwert betrug 11,9 $\pm$ 1,9 ng/ml und für die Fläche unter den 24-h-Absorptionskurven wurden 63,4 $\pm$ 8,4 Flächeneinheiten gemessen. Die Variationskoeffizienten für die Einzelwerte nahmen von 45,8% nach 1 Stunde auf 16% nach 24 Stunden ab (Abb. 26). Bei zwei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ergaben sich 24 Stunden nach oraler und intravenöser Gabe von 0,5 mg Digitoxin keine unterschiedlichen Serumdigitoxinspiegel. Die Serumdigitoxinspiegel betrugen nach peroraler Applikation 19,2 bzw. 9,4 ng/ml und nach intravenöser Gabe der gleichen Dosis 19,4 bzw. 8,o ng/ml (Körpergewicht: 4o,5 bzw. 84,8 kg).

5.2.4. Elimination von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei 4 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 5,5 - 12,8 mg%) wurde nach Erreichen des Äquilibriums der Serumdigitoxinkonzentration die Medikation von 0,1 mg Digitoxin/die abgesetzt und die Serumhalbwertzeit mit Hilfe der linearen Regression im halblogarithmischen Koordinatensystem bestimmt.
Die Serumhalbwertzeit betrug im Mittel 5,7 $\pm$ 0,9 (5,o - 6,9) Tage. Gegenüber gesunden Probanden war die Elimination von Digitoxin signifikant beschleunigt ($p < 0,05$). Die mittlere globale Eliminationskonstante k_e betrug 0,1246 $\pm$ 0,0170 $Tage^{-1}$ und der mittlere Korrelationskoeffizient für die Regressionsgeraden 0,9853 $\pm$ 0,0100.

Entsprechend der Eliminationskonstanten werden täglich 12,5% der Körpermenge an Digitoxin eliminiert.
Bei 2 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die nur eine einmalige perorale Dosis von 0,5 mg Digitoxin erhalten hatten, wurde die terminale Serumhalbwertzeit mit 4,7 $\pm$ 0,2 Tagen bestimmt. Die mittlere globale Eliminationskonstante k_e betrug 0,1492 $\pm$ 0,0071 $Tage^{-1}$ (Tab. 14).

5.2.5. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Äquilibrium

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beträgt die mittlere Körpermenge für Digitoxin bei einer mehrwöchigen peroralen Dosis von 0,1 mg/die und einer mittleren globalen Eliminationskonstanten von 0,1246 $Tagen^{-1}$ 0,8 mg (Abb. 46). Die Digitoxinkonzentration c_o wurde durch Extrapolation der durchschnittlichen Eliminationsgeraden (halblogarithmisches Koordinatensystem) auf die y-Achse ermittelt. Sie betrug 23,2 ng/ml.

	Halbwertzeit (Tage)	Anzahl der Digitoxin-bestimmungen	Meßzeitraum (Tage)	Serumkreatinin (mg %)	r
Kontrollgruppe[+] (n = 8)	7,6 ± 1,6[+++]	4 - 6	8 - 10	< 1,2	0,9895 ± 0,0173[+++]
Niereninsuffizienz[+]					
1. E.O.	6,9	7	11	12,0	0,9815
2. M.P.	5,6	5	7	7,0	0,9808
3. A.Fr.	5,0	8	9	14,5	0,9851
4. H.L.	5,1	6	7	6,0	0,9940
	5,7 ± 0,9[+++]				0,9853 ± 0,0100[+++]
5. A.R. [++]	4,8	6	7	7,0	0,9793
6. M.F. [++]	4,5	7	8	5,5	0,9777
	4,7 ± 0,2[+++]				0,9785 ± 0,0011[+++]

[+]Nach Abbrechen der oralen Erhaltungsdosis von 0,1 mg/die Digitoxin

[++] Bestimmung: HWZ von Digitoxin im Serum nach einer Einmaldosis von 0,5 mg Digitoxin p.o.

[+++] Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Tab. 14: Serumhalbwertzeiten für Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Das mittlere fiktive Verteilungsvolumen von Digitoxin errechnete sich nach folgender Gleichung:

$$V_d = \frac{M}{c_o} = \frac{800 \times 10^3}{23,2} = 34,4 \text{ l}$$

Verteilungskoeffizient = 0,51 l/kg (mittleres Körpergewicht = 68,0 kg).

5.2.6. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Pseudoäquilibrium

Bei 5 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 8,2 $\pm$ 2,7 mg%) wurde das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium nach einer intravenösen Dosis von 0,5 mg Digitoxin bestimmt.

Die Digitoxinkonzentration c_o wurde durch Extrapolation der Eliminationsgeraden (ß-Phase, halblogarithmisches Koordinatensystem) auf die y-Achse ermittelt. Sie betrug zum Zeitpunkt t_o 17,9 $\pm$ 5,9 ng/ml (Abb. 31). Nach 4 Stunden ist die Verteilungsphase abgeschlossen. Die Eliminationshalbwertzeit für die schnelle Anfangsphase, die im wesentlichen der Verteilungsphase entspricht, war bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Probanden gleich (Abb. 36).

Das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium errechnete sich nach der Gleichung

$$V_d = \frac{M}{c_o}$$

Als Körpermenge an Digitoxin wurde 0,5 mg angenommen, da die Exkretion im Meßzeitraum vernachlässigt werden konnte.

Bei den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ergab sich ein fiktives Verteilungsvolumen von 3o,3 ± 7,2 (17,2 - 37,6) l bzw. ein Verteilungskoeffizient von im Mittel 0,46 l/kg. Der Unterschied zu den Probanden war nicht signifikant ($p > 0,25$).

Abbildung 36 zeigt bei 7 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz die Verteilungskinetik von Digitoxin nach intravenöser Injektion von 0,75 mg Digitoxin. Bei einem angenommenen Plasmavolumen von 3,2 l (mittleres Körpergewicht: 66,4 kg, Hk = 36%, Geigy Tabellen) fanden sich nach 1 Stunde 14,5%, nach 2 Stunden 1o,7%, nach 4 Stunden 7,8% und nach 8 Stunden 6% der Dosis im Serum.

Die geringe Erhöhung des Serumpools von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz gegenüber gesunden Probanden beruht nicht auf einer unterschiedlichen Verteilungskinetik, sondern läßt sich durch den erhöhten Plasmaanteil am Blutvolumen erklären.

5.2.7. Renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n = 3, Kreatinin im Serum = 7,6 - 11,0 mg%) wurde die renale Exkretion (% der Dosis) von ^{3}H-Digitoxin nach intravenöser Injektion von 1oo µCi gemessen. Die Messung der ^{3}H-Aktivität erfolgte in einem Aliquot von 1 ml des 24-h-Urins mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers.

Es wurden innerhalb der ersten 24 Stunden 1,2 ± 0,22 (1,o - 1,5) % des injizierten ^{3}H-Digitoxins als ^{3}H-Aktivität im Urin ausgeschieden. Der renale Exkretionswert während einer Sammelperiode von 7 Tagen betrug 7% der Dosis. Der

Unterschied gegenüber Patienten mit Herzinsuffizienz war signifikant ($p < 0{,}0005$, Tab. 15).

Bei 6 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 8,7 $\pm$ 3,3 mg%) wurden unter Steady-state Bedingungen bei einer täglichen peroralen Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin 12,1 $\pm$ 6,1 (4,6 - 22,5) % der Dosis als Digitoxin und immunreaktive Metaboliten im Urin ausgeschieden (Tab. 16). Die renalen Exkretionswerte waren verglichen mit herzinsuffizienten Patienten signifikant erniedrigt ($p < 0{,}0125$).

5.3. Untersuchungen zum Metabolismus von Digitoxin bei Patienten mit Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz

Der Metabolismus von ^{3}H-Digitoxin wurde bei Patienten mit Herzinsuffizienz und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz untersucht. Den Patienten, die mit unmarkiertem Digitoxin aufgesättigt waren, wurde 100 µCi = 7 µg ^{3}H-Digitoxin intravenös injiziert. Die Metabolitenanalyse erfolgte im 24-h-Urin mit Hilfe von Extraktionsverfahren und der Dünnschichtchromatographie. Die bei der Dünnschichtchromatographie verwandten Laufmittelsysteme erlaubten insbesondere eine Klärung der Frage, ob eine signifikante 12-ß-Hydroxylierung und Abspaltung von Digitoxose stattfand.

In einem Aliquot des 24-h-Urins wurden nach dreimaliger Extraktion mit dem dreifachen Volumen an Dichlormethan die sog. wasserlöslichen oder polaren und die dichlormethanlöslichen Metaboliten des Digitoxins unterschieden. Die Messung der Einzelfraktionen erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler.

Diagnose	^3H - Aktivität (%) im Urin (1. Tag)	Serumkreatinin (mg %)	Urinvolumen (ml)
Niereninsuffizienz			
M. T.	1,5	7,6	2150
K. K.	1,1	11,0	1400
A. P.	1,0	10,8	1400
	$1,2 \pm 0,22$ +	$9,8 \pm 1,9$ +	1650 ± 433 +
Herzinsuffizienz			
A. H.	5,0	< 1,2	1680
H. W.	3,9	< 1,2	2330
G. T.	4,3	< 1,2	1950
	$4,4 \pm 0,56$ +		1987 ± 327 +
P	< 0,0005	> 0,15	

+Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Tab. 15: ^3H-Aktivitätsausscheidung im Urin (% der Dosis) nach intravenöser Injektion von 1oo µCi ^3H-Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Patienten mit Herzinsuffizienz.

Patienten	Digitoxinkonzentration im Urin^{+} (ng/ml)	renale Exkretion^{+} (% der tägl. Dosis)	Kreatinin im Serum^{+} (mg/100ml)
Niereninsuffizienz (n = 6)	8,7 ± 6,4	12,1 ± 6,1	8,7 ± 3,3
Herzinsuffizienz (n = 8)	26,1 ± 5,0	26,4 ± 11,0	< 1,2
	$p < 0,0005$	$p < 0,01$	

\+ Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Tab. 16: Digitoxinkonzentration im 24-h-Urin und renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Patienten mit Herzinsuffizienz unter einer peroralen Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die.

5.3.1. Dichlormethanlösliche (kardioaktive) Metaboliten des Digitoxins im Urin

Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme der Dichlormethanextrakte von 1oo ml Urin ergab bei 3 Patienten mit Herzinsuffizienz übereinstimmend am ersten Tag und am achten Tag, daß hauptsächlich Digitoxin nachzuweisen war (Abb. 32). Eine quantifizierbare 12-ß-Hydroxylierung und Hydrolyse konnte bei keinem Patienten gefunden werden. Bei zwei Patienten mit instabil kompensierter Niereninsuffizienz (Kreatininclearance $<$ 1o ml/min), die eine ausreichende Restdiurese hatten, zeigte sich im Dünnschichtchromatogramm des ersten und achten Tages ebenfalls vorwiegend Digitoxin (Abb. 33). Andere Metaboliten waren nicht abgrenzbar bzw. wegen eines zu geringen Anteils nicht identifizierbar.

5.3.2. Wasserlösliche, polare (sog. kardioinaktive) Metaboliten des Digitoxins im Urin

Die bedeutendste Metabolitengruppe des Digitoxins stellten die mit Dichlormethan nicht extrahierbaren sogenannten wasserlöslichen oder polaren Metaboliten dar. Sie machten bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz (n = 7) im Urin des ersten Tages 13,6 - 44,o% (im Mittel: 29,6 $\pm$ 12,6%) aus (Abb. 34). Die wasserlösliche Metabolitenfraktion des siebten Tages betrug 27,o $\pm$ 12,8% (n = 3). Bei drei niereninsuffizienten Patienten im Stadium der dekompensierten Retention (Kreatinin im Serum: 9,8 $\pm$ 1,9 mg%) fand sich am ersten Tag eine wasserlösliche Metabolitenfraktion von 19,6 $\pm$ 7,o%, die bis zum siebten Tag auf 36,9 $\pm$ 8,9% signifikant anstieg ($p < 0,025$). Die wasserlöslichen Metabolitenfraktionen des siebten Tages zeigten bei Patienten mit Herzinsuffizienz und Niereninsuffizienz deutliche, aber nicht signifikante Unterschiede (Abb. 34).

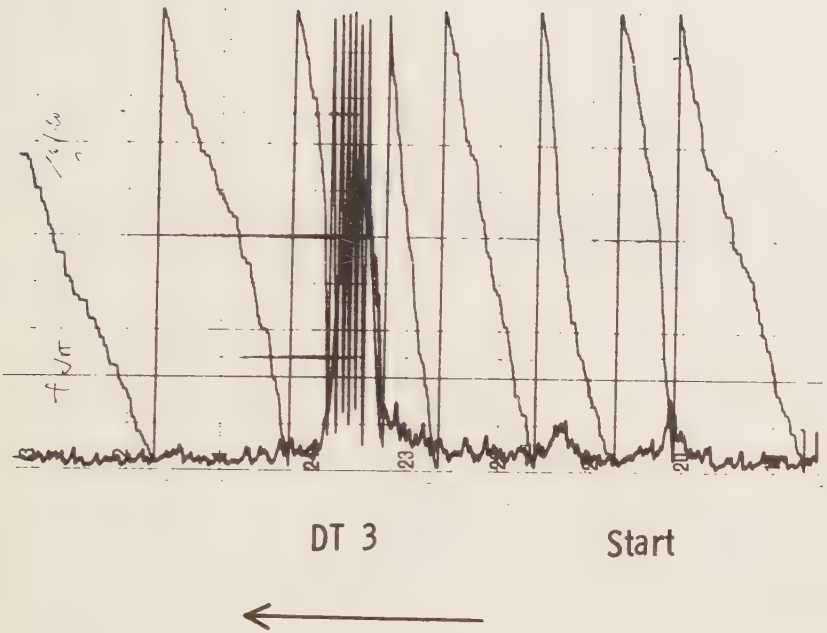


Abb. 32: Radiochromatogramm der CH_2 Cl_2-löslichen Phase des Urins nach intravenöser Gabe von 1oo µCi ^3H-Digitoxin von einem Patienten mit Herzinsuffizienz.
Fließmittelsystem 1

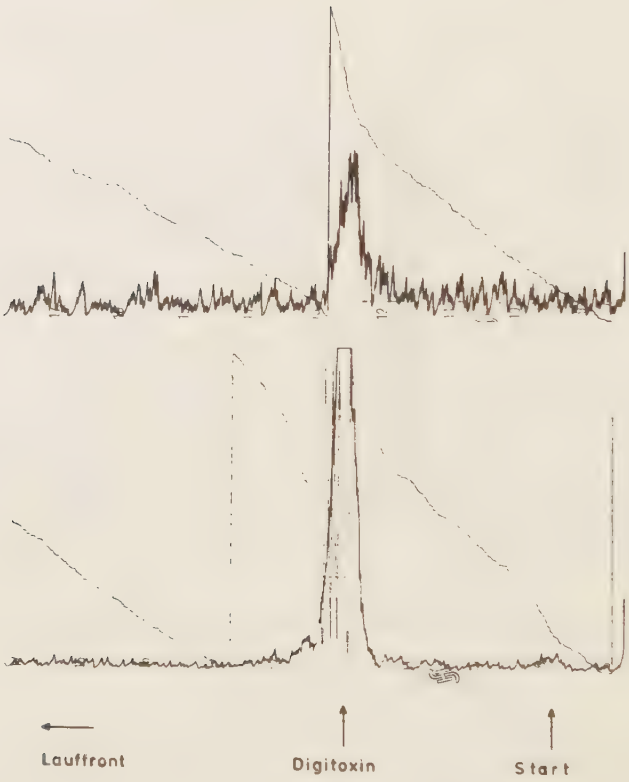


Abb. 33: Radiochromatogramm der $CH_2\ Cl_2$ löslichen Phase des Urins nach intravenöser Gabe von 1oo µCi ^{3}H-Digitoxin von einem Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich mit ^{3}H-Digitoxin-standardlösung (unten).
Fließmittelsystem 1

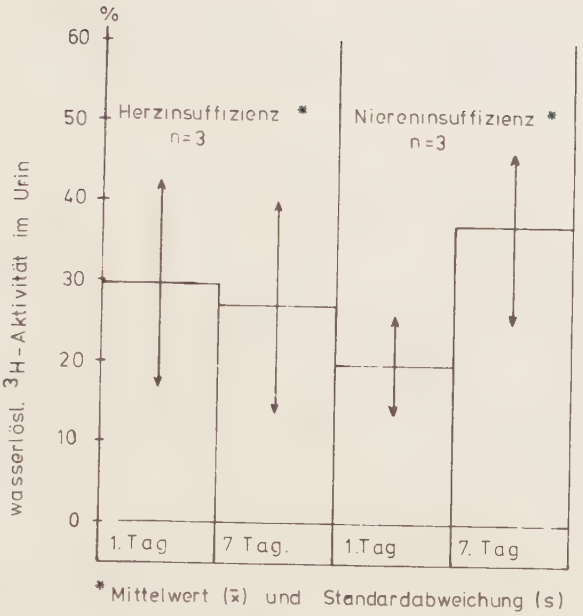


Abb. 34: Wasserlösliche Metabolitenfraktion des Digitoxins im Urin nach intravenöser Gabe von 100 µCi ^{3}H-Digitoxin.

5.4. Einfluß von Digitoxin auf die mit Hilfe nichtinvasiver Technik gemessenen herzdynamischen Parameter bei gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei gesunden Probanden (n = 6) und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n = 7) wurde der Einfluß des Digitoxins nach einer einmaligen intravenösen Gabe von 0,75 mg auf die frequenzkorrigierten systolischen Zeitintervalle und die Änderung der Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve (erster Differentialquotient der Carotispulskurve: Δ max dC/dt %) gemessen. Die Registrierung und Blutabnahme zur Digitoxinbestimmung erfolgten nach einer jeweiligen Ruhephase von 15 Minuten zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 4 und 8 Stunden. Die klinischen Daten zu den Patienten sind in Tab. 17 zusammengefaßt.

Bei den Probanden wurde nach intravenöser Digitoxinapplikation eine signifikante Verkürzung der mittleren Anspannungszeit (PEPI) von einem Ausgangswert von 113 $\pm$ 7,9 msec auf 86 $\pm$ 13 msec gemessen ($p < 0,05$). Das Maximum dieser Veränderung trat nach 2 - 4 Stunden auf. Die Austreibungszeit (LVETI) sank von 33o $\pm$ 23,4 msec auf minimal 316 $\pm$ 15 msec nach 8 Stunden. Der Unterschied war ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). Der Quotient PEP/LVET verminderte sich signifikant von 0,339 $\pm$ 0,01 auf 0,263 $\pm$ 0,04 (Abb. 35, $p < 0,05$).
Die Änderung der Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve betrug bei den einzelnen Probanden 3o - 1oo%. Das Maximum wurde nach 4 Stunden mit einer mittleren Änderung von 65,5 $\pm$ 32,1% (s) erreicht (Abb. 36).

Im Gegensatz zu den gesunden Probanden kam es lediglich bei 5 der 7 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Patienten	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Kreatinin i. Serum (mg/100ml)	Harnstoff N i. Serum (mg/100ml)	Kalium i. Serum (mval/l)
A. B.	51	64,0	3,8	29	4,8
P. D.	47	63,0	7,5	62	4,3
G. L.	59	72,0	8,3	77	5,4
H. L.	41	86,0	10,5	90	4,7
O. K.	51	46,5	3,3	49	5,7
A. L.	28	56,0	12,0	100	5,6
R. Sch.	27	77,8	8,4	74	4,9
	$43,4 \pm 12,1^{+}$	$66,5 \pm 13,3^{+}$	$7,7 \pm 3,2^{+}$	$68,7 \pm 24,3^{+}$	$5,1 \pm 0,5^{+}$
Kontrollgruppe (n = 6)	$28,0 \pm 4,0^{+}$	$67,0 \pm 9,4^{+}$	< 1,2	< 20	3,8-5,1

+ Mittelwert und Standardabweichung

Tab. 17: Klinische Angaben zu den Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und den Probanden, bei denen der Einfluß einer Einmaldosis von Digitoxin auf die nichtinvasiven, herzdynamischen Parameter gemessen wurde.

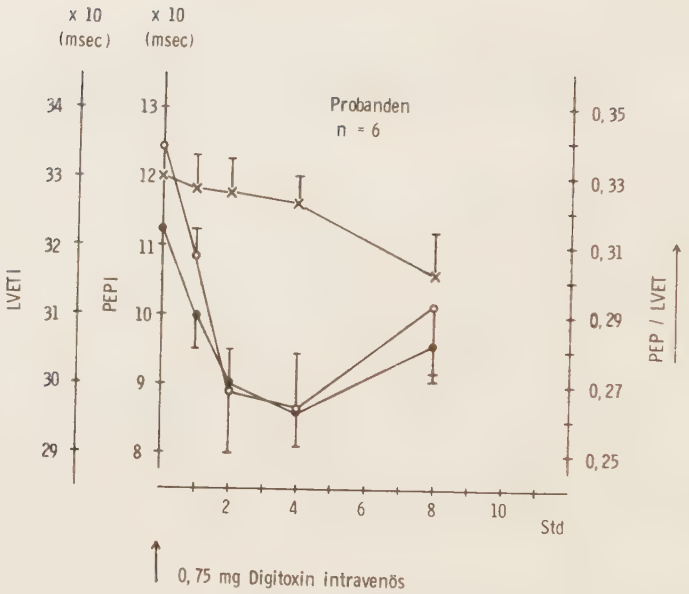


Abb. 35: Änderung der systolischen Zeitintervalle (x——x = LVETI, ●——● = PEPI, o——o = PEP/LVET) nach einmaliger intravenöser Gabe von 0,75 mg Digitoxin bei Probanden.

Mittelwert und Standardabweichung

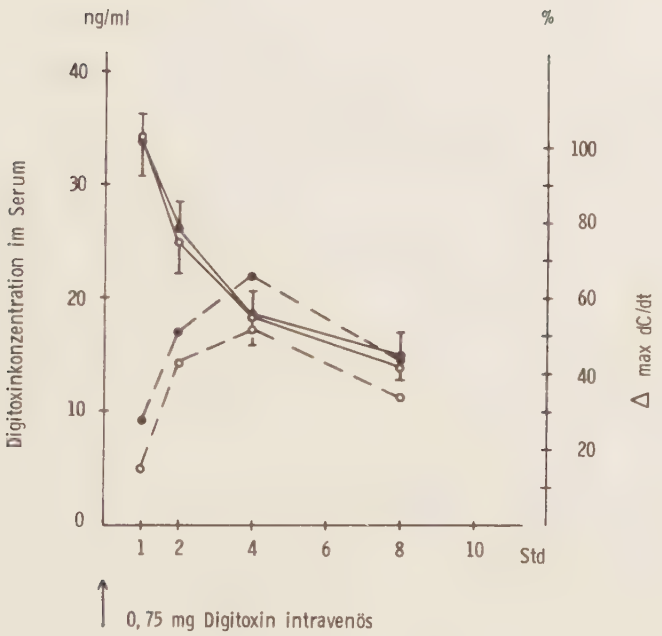


Abb. 36: Digitoxinkonzentrationen im Serum bei Probanden (●——●) und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (o——o) und Änderung der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve für Probanden (●---●) und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (o---o) nach 0,75 mg Digitoxin iv.

Mittelwert und Standardabweichung

nach der Digitoxindosis zu einer Verkürzung der Anspannungszeit (PEPI) (Abb. 37). Der Ausgangswert der mittleren Anspannungszeit lag mit 128 ± 22 msec gering höher als bei den Probanden (n.s.). Bei 2 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der dekompensierten Retention mit renaler Azidose (Tab. 17, Patienten: A.L. und R.Sch.) fand sich keine Beeinflussung dieses Parameters. Im Mittel wurde allerdings eine Verkürzung der Anspannungszeit von 128 ± 22 auf 11o ± 29 msec gemessen (n.s). Die Änderung der Austreibungszeit (LVETI) war dagegen unter Digitoxin ebenso wie bei den Probanden von 315 ± 13,2 msec auf 293 ± 11,5 msec nach 4 Stunden signifikant verkürzt ($p < 0,01$). Der Quotient PEP/LVET war bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Probanden mit einem mittleren Wert von 0,418 ± 0,088 gegenüber 0,339 ± 0,01 signifikant erhöht ($p < 0,025$). Eine Erniedrigung von PEP/LVET nach Digitoxingabe wurde lediglich bei 4 von 7 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gemessen (Abb. 38). Bei 3 Patienten bestand keine signifikante Änderung (P.D., A.L., R.Sch., Tab. 17).

Die Änderung der Pulskurvenanstiegsgeschwindigkeit der Carotispulskurve betrug bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 3o - 8o%. Sie lag zu jedem Zeitpunkt der Registrierung im Mittel niedriger als bei den gesunden Probanden. Das Maximum betrug 52,o ± 21,9% und trat wie bei den Probanden 4 Stunden nach der Digitoxingabe auf (Abb. 36). Bezüglich der maximalen Änderungen war zwischen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Probanden kein signifikanter Unterschied feststellbar ($p > 0,15$).

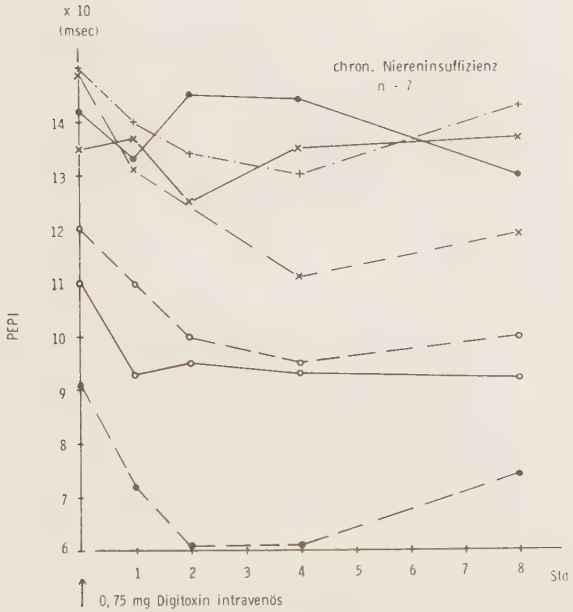


Abb. 37: Änderung der Anspannungszeit bei verschiedenen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nach 0,75 mg Digitoxin iv.

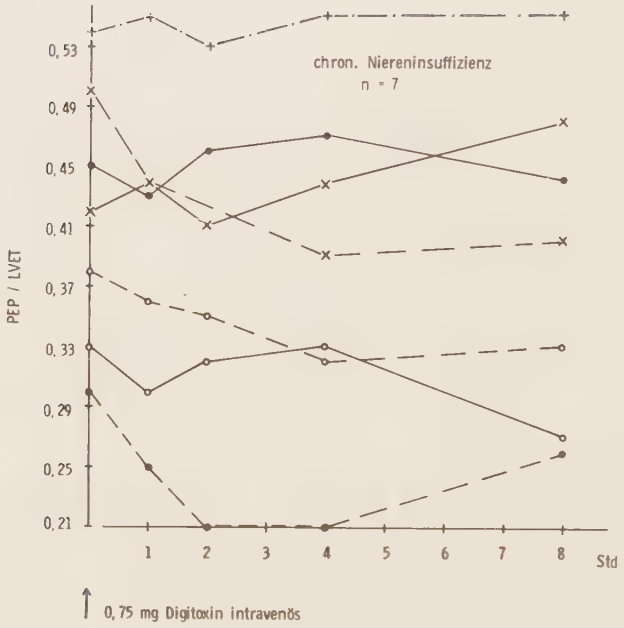


Abb. 38: Änderung des Quotienten PEP/LVET bei verschiedenen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nach 0,75 mg Digitoxin iv.

Die Serumdigitoxinkonzentrationen zeigten nach intravenöser Gabe bei den Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz einen steil abfallenden Verlauf, der der Verteilungsphase von Digitoxin im Körper entsprach. Zum Zeitpunkt der maximalen Beeinflussung der dynamischen Parameter (nach 4 Stunden) betrug der Serumdigitoxinspiegel 18,7 $\pm$ 4,2 ng/ml bzw. 18,3 $\pm$ 6,4 ng/ml. Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Probanden zeigten bezüglich der Verteilungskinetik von Digitoxin zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 36).

5.5. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose

5.5.1. Serumdigitoxinspiegel und Konzentration des eiweißungebundenen Digitoxins bei Patienten mit Leberzirrhose

Bei Patienten mit Leberzirrhose (n = 9), deren klinische Daten in Tab. 18 zusammengefaßt sind, wurde bei einer Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die ein Serumdigitoxinspiegel von 18,4 $\pm$ 3,1 ng/ml gemessen. Er lag niedriger als bei Patienten mit Herzinsuffizienz (n = 14), die eine Serumdigitoxinkonzentration von 22,8 $\pm$ 8,6 ng/ml aufwiesen. Der Unterschied war nicht signifikant ($p > 0,05$, Tab. 1o). Das eiweißungebundene Digitoxin im Serum war dagegen bei Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu herzinsuffizienten Patienten signifikant auf 1,5 $\pm$ 0,7 ng/ml ($\hat{=}$ 8,2% des Serumdigitoxinspiegels) gegenüber 0,8 $\pm$ 0,3 ng/ml ($\hat{=}$ 3,5% des Serumdigitoxinspiegels) erhöht ($p < 0,0025$).

Bei 6 von 9 Patienten mit Leberzirrhose betrug der Serumspiegel des freien Digitoxins mehr als 1,5 ng/ml und bei 3 dieser 6 Patienten mehr als 2,o ng/ml (Abb. 24).

5.5.2. Eiweißbindung von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose

Bei Patienten mit Leberzirrhose (n = 9) war die Eiweißbindung für Digitoxin signifikant auf 91,9 $\pm$ 4,1% (Bereich: 88,6 - 97,9%) gegenüber 96,2 $\pm$ 1,3% (Bereich: 93,4 - 97,9%) bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz erniedrigt ($p < 0,0025$). Die Eiweißbindung von zur Probe zugesetztem ^{3}H-Digitoxin (Konzentration: 3,5 ng/ml) war bei den gleichen Patienten mit Leberzirrhose auf 92,2 $\pm$ 5,2% (Bereich: 8o,8 - 96,6%) gegenüber herzin-

suffizienten Patienten (n = 4) mit 95,6 ± 1,3% (Bereich: 94,6 - 96,5) ebenfalls signifikant erniedrigt ($p < 0,025$, Tab. 1o).
Die Gesamteiweißkonzentration im Serum betrug bei Patienten mit Leberzirrhose 6,9 ± 0,6 g% und bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz 6,7 ± 0,8 g%. Die Albuminkonzentration war bei Patienten mit Leberzirrhose mit 3,o ± 0,33 g% gegenüber 3,6 ± 0,5 g% bei Patienten mit Herzinsuffizienz deutlich erniedrigt (Tab. 18).

5.5.3. Elimination von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose

Bei 6 Patienten mit Leberzirrhose wurde die Eliminationshalbwertzeit von Digitoxin im Serum nach Erreichen des Steady-state mit Hilfe der linearen Regression im semilogarithmischen System ermittelt. Dazu wurde die perorale Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die abgesetzt. Der Meßzeitraum erstreckte sich auf 1o - 14 Tage. Die mittlere Serumhalbwertzeit betrug 7,9 ± 2,o (4,2 - 11,o) Tage und unterschied sich gegenüber 7,6 ± 1,6 (4,8 - 9,3) Tage bei gesunden Probanden nicht signifikant ($p > 0,475$).
Die entsprechenden mittleren globalen Eliminationskonstanten k_e betrugen 0,0962 ± 0,0223 bzw. 0,0956 ± 0,0316 $Tage^{-1}$ (Tab. 8).

Somit werden bei Patienten mit Leberzirrhose täglich 9,6% der im Körper befindlichen Digitoxinmenge eliminiert (Tab. 19).

Patienten	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	S-GOT (mU/ml)	S-GPT (mU/ml)	AP (mU/ml)	Gesamteiweiß (g/100 ml)	Serumalbumin (g/100 ml)	Gammaglobulin (g/100 ml)	Bilirubin im Serum (mg/100 ml)	Diagnose
W. O.	66	76,8	13	11	130	6,0	3,2	1,6	1,3	postnekrot. Leberzirrhose
M. E.	76	81,5	53	20	345	7,6	2,5	3,6	3,5	postnekrot. Leberzirrhose
H. J. M.	35	67,5	44	31	235	6,2	3,1	1,7	1,9	postnekrot. Leberzirrhose
W. K.	43	79,2	44	39	275	7,4	3,0	2,8	6,5	postnekrot. Leberzirrhose
H. H.	41	69,7	51	18	258	7,6	3,4	2,0	0,9	Fettzirrhose
H. B.	70	59,2	9	7	110	7,0	3,2	1,8	0,6	postnekrot. Leberzirrhose
G. Sch.	64	51,8	99	310	330	7,5	2,8	2,9	0,9	postnekrot. Leberzirrhose primäres Leberkarzinom
E. K.	38	42,0	22	11	250	6,2	2,8	1,6	1,0	Fettzirrhose
K. E.	55	45,0	40	39	65	6,8	2,8	2,8	3,6	postnekrot. Leberzirrhose primäres Leberkarzinom
	54,2 ± 14,5*	63,6 ± 14,0*				6,9 ± 0,6*	3,0 ± 0,33*	2,3 ± 0,69*	2,2 ± 1,8*	
Kontrollgruppe (n = 14)	58,4 ± 13,8*	67,8 ± 11,5*				6,7 ± 0,8*	3,6 ± 0,5*	< 1,5	< 1,2	Herzinsuffizienz

* Mittelwert und Standardabweichung

Tab. 18: Klinische Angaben zu den Patienten mit Leberzirrhose, bei denen pharmakokinetische Daten von Digitoxin erhoben wurden.

Patienten	Digitoxineliminations-halbwertzeit im Serum[+] (Tage)	globale Eliminations-konstante k_e[+]
Leberzirrhose (n = 6)	7,9 ± 2,0 (4,8-9,3)	0,0956 ± 0,0316

\+ Mittelwert und Standardabweichung

Tab. 19: Serumhalbwertzeit von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose.

5.5.4. Fiktives Verteilungsvolumen von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose im Pseudoäquilibrium

Bei 3 Patienten mit Leberzirrhose wurde das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium nach intravenöser Injektion von 0,75 mg Digitoxin bestimmt. Die Konzentration von Digitoxin c_o zum Zeitpunkt t_o wurde durch Extrapolation der einzelnen Eliminationsgeraden (ß Phase, halblogarithmisches Koordinatensystem) auf die y-Achse ermittelt. Die Digitoxinkonzentrationen c_o betrugen für die 3 Patienten mit Leberzirrhose 11,5, 16,5 und 8,8 ng/ml. Das fiktive Verteilungsvolumen wurde nach der Gleichung

$$V_d = \frac{M}{c_o}$$

berechnet (s. Kapitel 5.1.7.).

Unter Vernachlässigung der Exkretion ergab sich ein mittleres fiktives Verteilungsvolumen von 65,3 $\pm$ 19,9 l und ein mittlerer Verteilungskoeffizient von 1,o4 l/kg. Das fiktive Verteilungsvolumen lag signifikant über dem entsprechenden Verteilungsvolumen von Probanden, das 32,3 $\pm$ 3,1 l betrug ($p < 0{,}005$) (Abb. 39).

Bei einem Patienten (V_d = 85,2 l) mit etwa 1o l Aszites wurde die Digitoxinkonzentration im Aszites (Eiweißkonzentration: 2,5 g%) und im Serum bestimmt. Sie betrug im Aszites 0,8 ng/ml und entsprach 1o% des Serumspiegels. Bei einer Körpermenge von 0,75 mg Digitoxin befanden sich etwa 1,1% der im Körper vorhandenen Digitoxinmenge im Aszites und 3% im Serum.

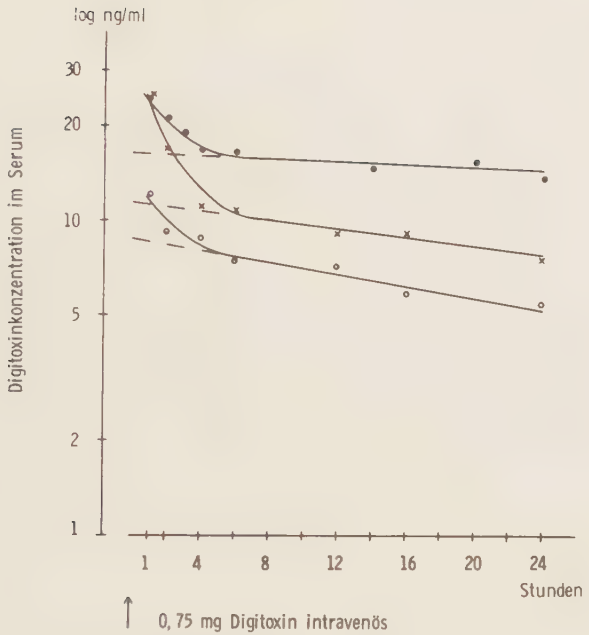


Abb. 39: Eliminationskurven von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose (n = 3) nach einmaliger intravenöser Gabe von 0,75 mg Digitoxin.

5.5.5. Renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose

Bei Patienten mit Leberzirrhose (n = 7) wurde unter Steady-state Bedingungen bei einer täglichen Dosis von 0,1 mg Digitoxin 42,2 $\pm$ 13,6% (Einzelwerte: 23,3 - 56,9%) der Dosis im Urin ausgeschieden. Gegenüber herzinsuffizienten Patienten (n = 8), bei denen 26,4 $\pm$ 11,0% der Dosis im Urin ausgeschieden wurde, war der Unterschied signifikant ($p < 0,025$). Die renale Clearance von Digitoxin war bei Patienten mit Leberzirrhose auf 1,6 $\pm$ 0,5 ml/min. gegenüber 1,1 $\pm$ 0,2 ml/min. bei herzinsuffizienten Patienten signifikant erhöht ($p < 0,0125$, Tab. 2o).

Patienten	Digitoxinkonzentration im Urin+ (ng / ml)	renale Exkretion+ (% der tägl. Dosis)	renale Clearance+ (ml / min)
Leberzirrhose (n = 7)	30,8 ± 9,7	42,2 ± 13,6	1,6 ± 0,5
Herzinsuffizienz (n = 8)	26,1 ± 5,0	26,4 ± 11,0	1,1 ± 0,2
	$p > 0,1$	$p < 0,025$	$p < 0,0125$

+ Mittelwert und Standardabweichung

Tab. 2o: Digitoxinkonzentration im 24-h-Urin und renale Exkretion von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose und Patienten mit Herzinsuffizienz unter einer peroralen Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die.

5.6. Serumdigoxinspiegel bei Patienten mit Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz

Bei 1oo Patienten mit Herzinsuffizienz eines unausgewählten Krankengutes fanden wir einen radioimmunologisch bestimmten Digoxinspiegel von 1,5 $\pm$ 0,8 ng/ml (modifizierte Methode nach Smith, Butler und Haber 1969).

Bei 41 Patienten mit Herzinsuffizienz, die unter einer täglichen Dauertherapie von 0,25 mg Digoxin (Lanoxin^R Tabletten) standen, betrug der Serumdigoxinspiegel 1,1 $\pm$ 0,7 ng/ml.

Bei 6 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 3,o $\pm$ 1,4 mg%) wurde bei der gleichen Dosierung ein signifikant erhöhter Serumdigoxinspiegel von 2,2 $\pm$ 1,o ng/ml gemessen ($p < 0,0025$). Bei einer Dosierung von 0,125 mg Digoxin/die betrug bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz der mittlere Digoxinspiegel (n = 4) 1,1 $\pm$ 0,6 ng/ml. Toxische Digoxinspiegel (n = 7) waren mit 3,7 $\pm$ 1,1 ng/ml signifikant erhöht ($p < 0,0005$, Tab. 21).

5.6.1. Dihydrierte Metaboliten des Digoxins bei Patienten mit Herzinsuffizienz

Bei 1oo Patienten, die sich entweder in der Aufsättigungsphase oder unter einer konstanten Erhaltungsdosis von Digoxin befanden, wurden mit Hilfe der Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor in Zusammenarbeit mit L. Falk und S.M. Kalman (Department of Pharmacology, Medical School Stanford,California) die dihydrierten Metaboliten des Digoxins im Urin bestimmt. Abbildung 4o zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Anteile der dihydrierten Metaboliten an der mit Dichlormethan extrahier-

Diagnose	Patienten n	Dosis (mg/d)	Serumdigoxin (ng/ml)+
Herzinsuffizienz	41	0,25	1,1 ± 0,7
Niereninsuffizienz	6	0,25	2,2 ± 1,0
Digoxinintoxikation	7	> 0,25	3,7 ± 1,1

+ Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

Tab. 21: Digoxinkonzentrationen im Serum bei Patienten mit Herzinsuffizienz, chronischer Niereninsuffizienz und Digoxinintoxikation.

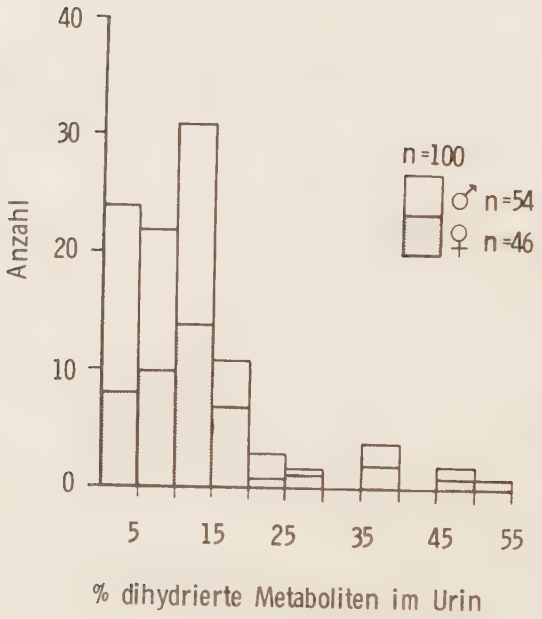


Abb. 4o: Anteil der dihydrierten Metaboliten des Digoxins in der CH_2Cl_2-löslichen Phase des Urins bei Patienten mit Herzinsuffizienz.

baren Gesamtkonzentration. Der Mittelwert betrug 12,4 $\pm$ 11% (s), wobei die Einzelwerte von 2,2 bis 52% reichten. 15 von den 24 Patienten in der Gruppe mit 0 - 5% dihydrierten Metaboliten hatten Metabolitenkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Assays. Bei 31% der Patienten ließen sich dihydrierte Metaboliten mit einem Anteil zwischen 1o und 15% nachweisen. Bei 7% der Patienten wurden mehr als 35% dihydrierte Metaboliten im Urin ausgeschieden.

Abbildung 41 zeigt die Beziehung zwischen dem Anteil an reduzierten Metaboliten des Digoxins im Urin und der Behandlungsdauer. Während der Aufsättigungsphase und anschließenden Erhaltungstherapie stieg der Anteil der dihydrierten Metaboliten von 6,4 $\pm$ 1,3% (SEM, n = 17) auf 13,6 $\pm$ 1,4% (SEM, n = 72) nach etwa 3o Tagen an ($p < 0,01$).

Fallstudie:

Eine 7o-jährige, 75 kg schwere Patientin erhielt in einem Beobachtungszeitraum von 14 Monaten eine tägliche perorale Erhaltungsdosis von 1,25 mg Digoxin (Lanoxin^R Tabl.) zur Reduzierung der Kammerfrequenz bei Tachyarrhythmia absoluta und Vorhofflimmern. Es bestanden keine Zeichen der Digitalisintoxikation, der Hyperthyreose oder eines Malabsorptionssyndroms. Im Urin schied sie 0,49 mg entsprechend 4o% der täglichen Digoxindosis aus. Davon entfielen 52% auf reduzierte Digoxinmetaboliten (Abb. 42).
Im Serum lag 4o% des Digoxins in reduzierter Form vor. Der radioimmunologisch gemessene Serumdigoxinspiegel betrug 3,2 ng/ml (Kreuzreaktivität des Digoxinantikörpers gegenüber Dihydrodigoxin 3o%). Mit Hilfe der Gaschromatographie fanden wir einen Digoxinspiegel von 2,6 ng/ml und einen Spiegel an dihydrierten Metaboliten von 1,7 ng/ml.

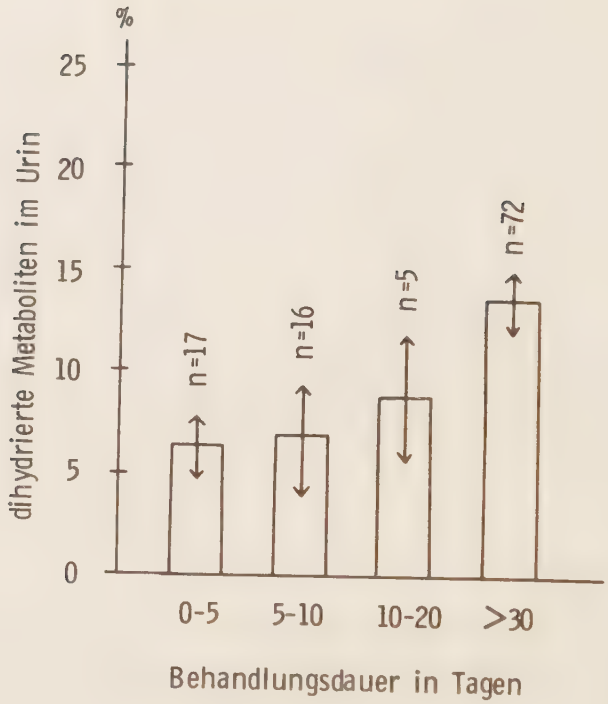


Abb. 41: Abhängigkeit des Anteils der dihydrierten Metaboliten des Digoxins in der CH_2Cl_2-löslichen Phase des Urins von der Behandlungsdauer.

Mittelwert und Standardirrtum des Mittelwertes (SEM)

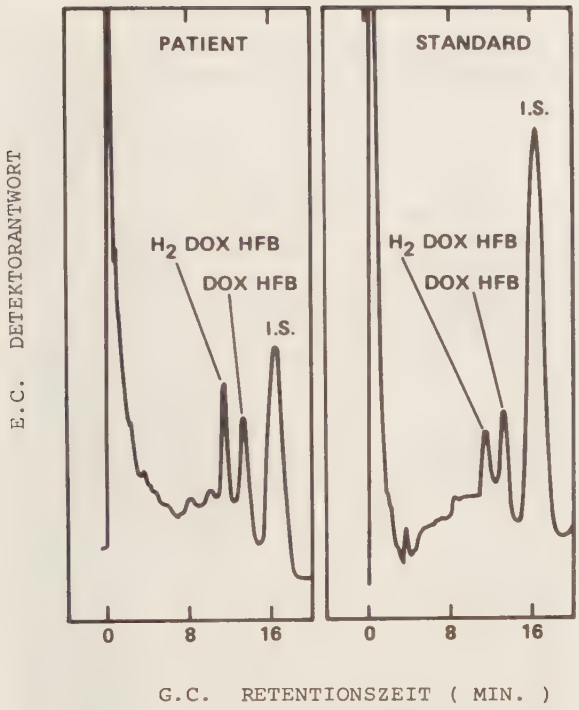


Abb. 42: Gaschromatogramm (GC-EC) des Dichlormethanextrakts des Urins von einem Patienten, der mit einer täglichen peroralen Dosis von 1,25 mg Digoxin (Lanoxin^R Tabl.) behandelt wurde. Trennung der Derivate der dihydrierten Metaboliten (H_2-DOX HFB) von den nichthydrierten Metaboliten des Digoxins (DOX HFB). Als interner Standard wird Digitoxigenin HFB verwandt. Auf der rechten Seite sind die Standardsubstanzen zur Ermittlung der Eichkurve abgebildet.

Tabelle 22 zeigt die einzelnen hydrolytischen und hydrierten Metaboliten des Digoxins, die bei dieser Patientin im Urin gefunden wurden. Dihydrodigoxin war mit 45% der Hauptmetabolit des Digoxins im Urin.

Metaboliten	%
DG - 3	27
H_2 - DG - 3	45
DG - 2	3
H_2 - DG - 2	5
DG - 1	12
H_2 - DG - 1	2
DG - O	6
H_2 - DG - O	O

Abbildung 43 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Urinextrakts dieser Patientin auf einer Al_2O_3-Platte nach kompletter Säurehydrolyse. Die hydrierten und nichthydrierten Metaboliten konnten als Dihydrodigoxigenin und Digoxigenin sichtbar gemacht werden.

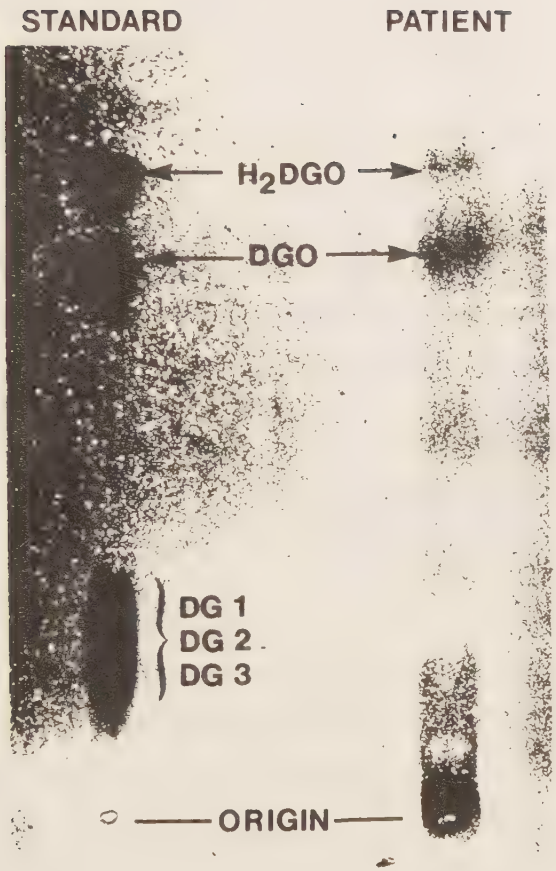


Abb. 43: Chromatogramm von Digoxin und seinen dihydrierten und nichthydrierten Metaboliten auf einer Al_2O_3-Dünnschichtplatte. Auf der linken Seite Auftrennung von Standardsubstanzen, auf der rechten Seite Auftrennung vom Dichlormethanextrakt des Urins nach Säurehydrolyse bei einem Patienten, der mit Digoxin (Lanoxin^R Tabl.) behandelt wurde.

5.6.2. Dihydrierte Metaboliten des Digoxins bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Bei 1o Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Kreatinin im Serum: 3,o $\pm$ 1,4 mg%) wurden verglichen mit 41 Patienten mit Herzinsuffizienz keine signifikant unterschiedlichen Mengen an hydrierten Digoxinmetaboliten im Urin gefunden. Es fanden sich 14,6 $\pm$ 3,5% (SEM) und 14,8 $\pm$ 1,9% (SEM) (Abb. 44).

5.6.3. Dihydrierte Metaboliten des Digoxins bei Patienten mit Digoxinintoxikation

Bei 7 Patienten mit den klinischen Zeichen einer Digoxinintoxikation betrug der Serumdigoxinspiegel 3,7 $\pm$ 1,1 ng/ml (s). Die dihydrierten Metaboliten machten 1o,6 $\pm$ 2,o% (SEM) der CH_2Cl_2 extrahierbaren Digoxinmetaboliten im Urin aus. Die Einzelwerte lagen zwischen $<$ 5 und 17,2%.

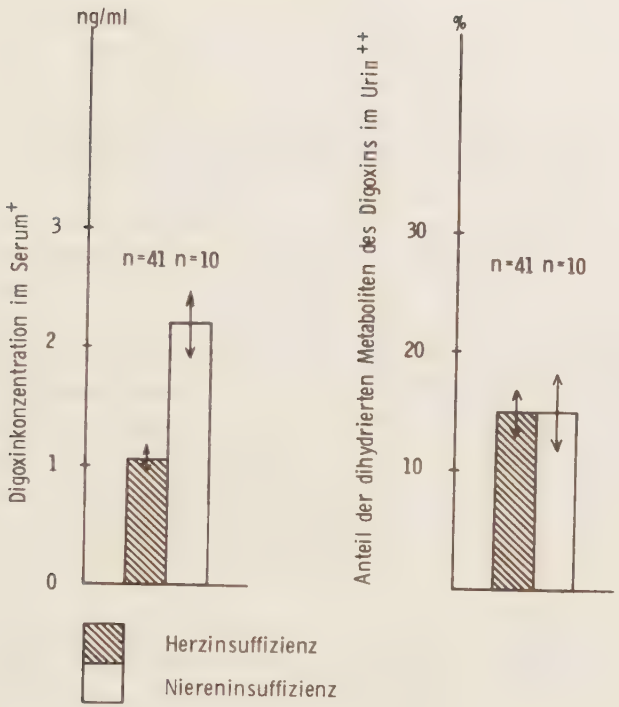


Abb. 44: Serumdigoxinkonzentrationen und Anteil der dihydrierten Metaboliten des Digoxins in der $CH_2\ Cl_2$-löslichen Phase des Urins bei Patienten mit Herzinsuffizienz und bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.
Linke Seite: Mittelwert und Standardabweichung.
Rechte Seite: Mittelwert und Standardirrtum des Mittelwertes (SEM)

6. Diskussion

6.1. Bedeutung von Serumspiegeln und Körpermenge der Digitalisglykoside Digitoxin und Digoxin

Mit der Entwicklung von genügend empfindlichen und technisch nicht allzu aufwendigen Digitalisbestimmungsmethoden (Radioimmunoassay, ^{86}Rb-Hemmethode, Na^+, K^+ ATPase Assay) ist es möglich geworden, für die gebräuchlichen Herzglykoside (Digoxin, Digitoxin, Strophanthin) therapeutische Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten und im Gewebe zu messen (Löwenstein 1965, Oliver 1968, Burnett und Conklin 1968, Smith et al. 1969, Larbig et al. 1972, Strobach et al. 1972, Gjerdrum 1972, Greeff 1974, Güllner et al. 1974, Haasis et al. 1977).

Gleichzeitig lassen sich Digitalisspiegel mit der Effizienz der Therapie aber auch mit Intoxikationssymptomen in Beziehung setzen (Smith 197o und 1975, Beller et al. 1971, Bertler und Redfors 1971, Howard et al. 1973, Peters et al. 1974, Ingelfinger und Goldman 1976).

Somit wurden Einblicke in die pharmakokinetischen Eigenheiten und pharmakodynamischen Wirkungen der einzelnen Herzglykoside gewonnen (Shapiro et al. 197o, Wilson et al. 197o, Lukas 1973), die bisher nur durch die klinischen Beobachtungen erhalten wurden.

Zur Klärung der zellulären Wirkungsmechanismen der Digitalisglykoside an der Herzmuskelzelle, wie sie von Greeff (1968) sowie Greeff und Bonn (1976) zusammenfassend berichtet wurden, haben die neuen Erkenntnisse allerdings nicht beitragen können. Für die Therapie erscheint der Begriff der Kumulation der

Herzglykoside, der von Withering (1785) bereits als ihre wesentliche Eigenschaft angesehen wurde, in einem neuen Licht.

Edens (1936) stellte hierzu im Rückblick auf die Literatur noch fast resignierend fest: "Als der Weisheit letzter Schluß ergab sich, daß die Digitalis langsamer weggeschafft als aufgenommen wurde."

Es ist das Verdienst von Augsberger (1954), die Unterschiede der einzelnen Herzglykoside in ihrem Kumulationsverhalten auf eine gesetzmäßige vor allem aber auch wertfreie Grundlage gestellt zu haben, wenn er feststellt: "Ob der Therapeut die Kumulation der Herzglykoside schätzt oder schilt, ob er sie zu nützen oder zu meiden glaubt - das Kumulationsvermögen ist die wichtigste Eigenschaft, in der sich die Glykoside voneinander unterscheiden."

Dieses Kumulationsgesetz hatte zur Grundlage, daß sich die aktuelle Wirkung (Wirkspiegel) aus zugeführter Substanzmenge und dem Wirkungsverlust pro Zeit zusammensetzt. Es stellt sich dann ein Höchstwert der Kumulation ein, wenn zugeführte Glykosidmenge (Dosis) und Wirkungsverlust in der Zeiteinheit konstant sind.

Die aufgrund klinischer Angaben (Gold 1946) dargestellte Gesetzmäßigkeit der glykosidspezifischen Kumulation konnte in den letzten Jahren durch Meßdaten belegt werden. Somit war die Digitalisforschung auf eine meßbare Grundlage gestellt.

Seit Shannon (1945) für einzelne Antimalariamittel nachweisen konnte, daß Serumspiegel besser als Pharmakondosen die pharmakologischen Wirkungen widerspiegeln, hat sich

dieses Konzept durchgesetzt (Brodie und Reid 1971). In Bezug auf die Digitalisglykoside sind einige der von Augsburger eingeführten Begriffe wie z.B. Volldosis oder Wirkspiegel wieder verlassen worden, da sie ausschließlich an Dosen und Wirkung orientiert waren und über die im Körper verbliebene Digitalismenge oder Serumdigitalisspiegel keine Aussage erlaubten. Sie wurde durch die meßbare Größe z.B. der des Körperpools ersetzt (Dengler et al. 1977). Der Körperpool eines Herzglykosids ist durch die im Körper vorhandene Glykosidmenge definiert und läßt sich aus der in den Körper aufgenommenen Glykosidmenge und der Eliminationshalbwertzeit berechnen.

Im Steady-state wird der Körperpool durch die täglich absorbierte Digitalismenge und die Eliminationshalbwertzeit bestimmt (Goldstein, Aronow und Kalman 1969).

$$\text{Körpermenge (mg)} = \frac{\text{Erhaltungsdosis (mg)} \times F}{k_e}$$

F = Faktor für die biologische Verfügbarkeit

k_e = globale Eliminationskonstante

Für das Digoxin konnten Dengler et al. (1977) eine signifikante Korrelation zwischen dem Körperpool und dem Serumdigoxinspiegel nachweisen. Dieses setzt allerdings voraus, daß das Verteilungsvolumen keinen größeren Schwankungen unterliegt. Der therapeutische Körperpool für Digitoxin und Digoxin liegt zwischen 0,8 - 1,5 mg (Abb. 45, 46, 47, Lukas und Peterson 1966, Jelliffe 1970, Gjerdrum 1972, Dengler et al. 1977, Smith et al. 1977). Der Plasma- bzw. Serumpool von Digitoxin macht nur 6,5% des Körperpools aus. Der Wert für den Blutpool von Digitoxin ändert sich praktisch nicht, da nach Untersuchungen von Lukas und Peterson (1966) nur 2% des Plasmapools von Digitoxin in den Erythrocyten gebunden werden. 93,5% des Digitoxins ist

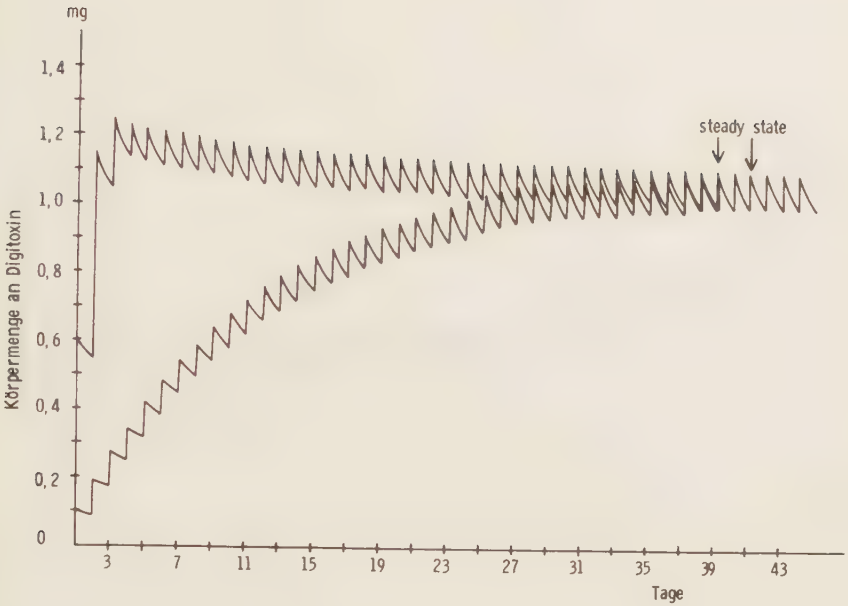


Abb. 45: Körpermenge an Digitoxin bei Probanden nach peroraler Aufsättigung mit 0,6, 0,6, 0,2 mg Digitoxin an den ersten drei Tagen und anschließender Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/d, außerdem nach Aufsättigung mit 0,1 mg Digitoxin/d. Mittlere Eliminationskonstante k_e= 0,0956 $Tage^{-1}$, Körpermenge an Digitoxin im Steady-state: 1,1 mg

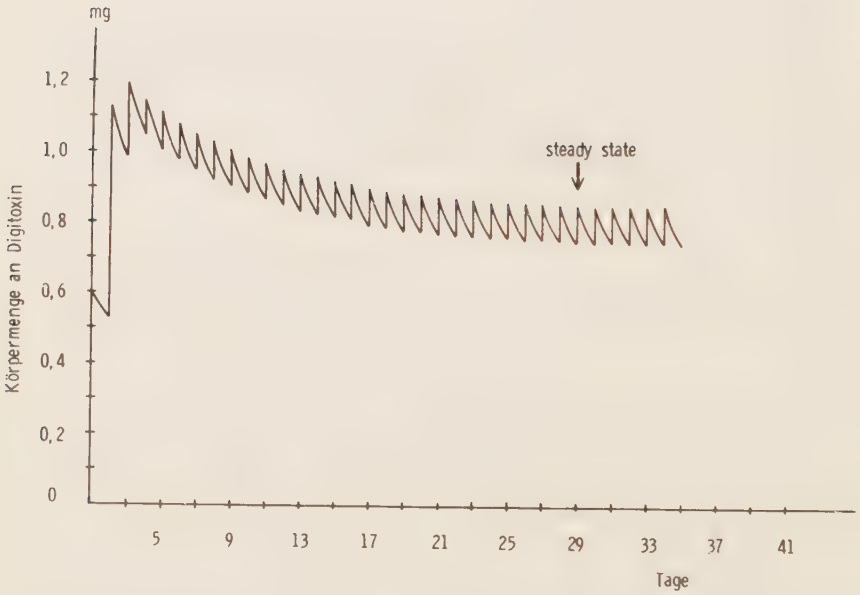


Abb. 46: Körpermenge an Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz nach peroraler Aufsättigung mit 0,6, 0,6, 0,2 mg Digitoxin an den ersten drei Tagen und einer Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/d. Mittlere Eliminationskonstante k_e = 0,1246 Tage $^{-1}$, Körpermenge an Digitoxin im Steady-state: 0,8 mg.

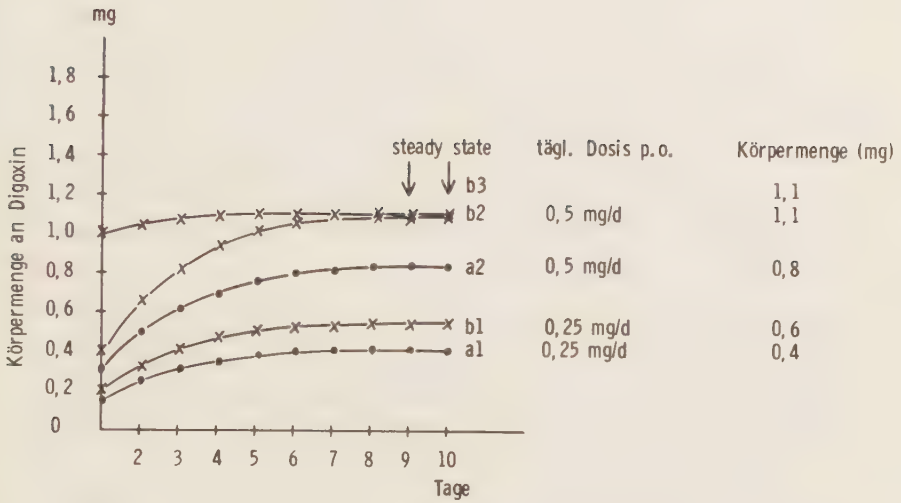


Abb. 47: Körpermenge an Digoxin nach peroraler Aufsättigung mit Digoxin (Kurven a1 - 2) und ß-Acetyldigoxin (Kurven b1 - 3), außerdem nach einer Schnellsättigung mit 1,0 mg bzw. 1,25 mg Digoxin iv. bzw. p.o. am ersten Tag und anschließender Erhaltungsdosis von 0,5 mg ß-Acetyldigoxin (Kurve b3).
Kurven a1-2: Resorptionsquote 6o%, k_e = 0,35 Tage^{-1}
Kurven b1-3: Resorptionsquote 8o%, k_e = 0,35 Tage^{-1}

somit auf periphere Kompartimente des Körpers verteilt und zum größten Teil an Gewebestrukturen bzw. Gewebeeiweiß gebunden.

Beim Digoxin sind die Verhältnisse wegen der geringeren Eiweißbindung anders. Digoxin ist fast gleichmäßig auf Plasma und Erythrocyten verteilt (Abshagen et al. 1971). Der Blutpool beträgt nur 0,6 - 1,0% der gesamten Körpermenge. Wie sich der Körperpool von Digoxin durch Änderung von Absorptionsrate und Eliminationshalbwertzeit ändert, wird aus Abb. 47 ersichtlich.

Seit 1973 werden in unserer Klinik regelmäßig Serumspiegel von Digitoxin und Digoxin radioimmunologisch bestimmt. Insgesamt werden etwa 1ooo Digitoxin- und etwa 3ooo Digoxinbestimmungen pro Jahr durchgeführt.

Von der Digitoxinbestimmung entfallen etwa 5o% auf klinische Routinebestimmungen und die restlichen betreffen wissenschaftliche Fragestellungen. Diese relativ hohe Zahl an Routinebestimmungen für Digitoxin kommt dadurch zustande, daß im Gegensatz zu dem niedrigen Marktanteil des Digitoxins von 4% aller verordneten Herzglykoside (Aschenbrenner 1977) in unserer Klinik 4o% der Patienten bei einer Herzinsuffizienz mit Digitoxin behandelt werden.

Mit dem Radioimmunoassay werden der eiweißungebundene und der eiweißgebundene Glykosidanteil erfaßt. Die Messung des freien Digitoxins im Serum erfordert zusätzlich die Bestimmung der Eiweißbindung. Beim Digoxin wird sich die Messung des freien Digoxins erübrigen, da der gemessene Serumspiegel zu 7o - 8o% dem eiweißgebundenen Digoxin im Serum entspricht.

Außerdem bietet sich beim Digoxin die Bestimmung der Digoxinkonzentration im Speichel an, da wie z.B. bei

der Acetylsalicylsäure, dem Paracetamol und Theophyllin die Konzentration im Speichel ein Maß für die freie Fraktion im Serum darstellt (Graham und Rowland 1972, Glynn und Bastain 1973, Koysooko et al. 1974, Huffman 1974, Dvorchik und Vesell 1976).

Die Speichelkonzentration des Digitoxins ist dagegen kein Äquivalent für die freie Digitoxinfraktion des Serums, da nach eigenen Untersuchungen keine Korrelation zwischen beiden bestand. Die Konzentration im Speichel übertraf um das 2 - 5fache die eiweißungebundene Digitoxinkonzentration im Serum und konnte bis zu 32% des Serumspiegels ausmachen. Diese Ergebnisse stehen mit denen von Wood et al. (1975) im Einklang, die ähnlich hohe Digitoxinkonzentrationen im Speichel gemessen haben. Beim Digitoxin, das zu 97% im Serum an Eiweiß gebunden ist, werden sich Änderungen in der Eiweißbindung wesentlich stärker auswirken als beim Digoxin, das nur zu etwa 25% eiweißgebunden vorliegt. Wir haben daher der Messung der freien Digitoxinfraktion bei den verschiedenen Krankheitszuständen besondere Bedeutung beigemessen.

6.2. Pharmakokinetik von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz

Bei der chronischen Niereninsuffizienz ist eine manifeste Herzinsuffizienz in den meisten Fällen Folge einer langandauernden Hypertonie oder einer koronaren Herzerkrankung. Eine Behandlung mit Herzglykosiden ist daher häufig notwendig.

Erfahrungen über den Einfluß der chronischen Niereninsuffizienz auf die Kumulation und Verträglichkeit von

Herzglykosiden stützten sich bis vor wenigen Jahren im wesentlichen auf klinische Beobachtungen (Gold 1946, Augsberger 1951, 1954, Gillmann und Grosse-Brockhoff 1963). Es war das Verdienst von Scheler und seiner Arbeitsgruppe (1965), bei der chronischen Niereninsuffizienz auf die Unterschiede im Kumulationsverhalten der Digitalisglykoside hingewiesen zu haben.

Lukas und Peterson (1966) berichteten erstmalig über zwei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, bei denen mit der Doppelisotopenmethode erniedrigte Serumdigitoxinspiegel gemessen wurden. Rasmussen et al. (1971 a) zeigten dann in einer größeren Studie mit der ^{86}Rb-Hemmethode, daß die Serumdigitoxinspiegel bei der chronischen Niereninsuffizienz im Vergleich zu Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz erniedrigt waren.

Bei unseren Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz dienten als Vergleichsgruppe Probanden und Patienten mit einer Herzinsuffizienz, bei denen keine Hinweise für eine Nieren- oder Lebererkrankung bestanden.
Wir fanden, daß die Serumdigitoxinspiegel bei der chronischen Niereninsuffizienz gering niedriger, keinesfalls aber höher liegen als in der Vergleichsgruppe mit alleiniger Herzinsuffizienz. Unter einer peroralen Dosis von 0,1 mg Digitoxin/die betrug der Serumdigitoxinspiegel 23,2 $\pm$ 7,8 ng/ml und unter einer Dosis von 0,143 mg Digitoxin/die 29,9 $\pm$ 6,6 ng/ml. Demgegenüber wurden bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz 26,5 $\pm$ 7,3 bzw. 33,5 $\pm$ 5,5 ng/ml gemessen.

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention mit ausreichender Restdiurese lag der Serumdigitoxinspiegel gering niedriger

als bei Patienten im Stadium der Dauerdialyse. Es bestand zudem eine signifikante Abhängigkeit der Serumdigitoxinkonzentration von dem Albumingehalt im Serum ($p < 0,01$, $r = 0,632$o; Peters et al. 1974).

Zwischen Digitoxindosis und Serumdigitoxinspiegel bestand eine signifikante Korrelation, während eine solche zwischen Serumspiegel und Serumkreatinin nicht nachweisbar war (Peters et al. 1974).
Bei Patienten mit zusätzlichem nephrotischen Syndrom fanden wir in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Frau L. Storstein (1976 b) Serumdigitoxinspiegel, die um 5o% niedriger lagen als bei den übrigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Neben der erniedrigten Eiweißbindung soll der renale Verlust an eiweißgebundenem Digitoxin hierfür verantwortlich sein (Storstein 1976 b).

Die große Streubreite der Serumdigitoxinspiegel in unserem Patientengut (VK = 16,8 - 33,6%) weist darauf hin, daß die Dosis allein ein unzuverlässiger Parameter für die zu erwartenden Serumspiegel ist. Aber auch Gewebekonzentrationen von Digitoxin und Digoxin im Herzmuskel unterlagen ähnlich großen interindividuellen Streuungen (Binnion et al. 1969, Coltart et al. 1972, Lukas 1973, Güllner et al. 1974, Haasis et al. 1977).

Nach Untersuchungen von Lukas und Peterson (1966) und denen unserer Arbeitsgruppe (1974) stellt neben der Dosis vor allem das Körpergewicht bzw. die fettfreie Körpermasse als Verteilungsraum eine bestimmende Größe für die Serumdigitoxinspiegel dar. Für das Digoxin berichteten Larbig et al. (1978) und Schneider und Ruiz-Torres (1977) über ähnliche Ergebnisse.

Für den Steady-state Serumspiegel lassen sich die Zusammenhänge mit folgender Gleichung beschreiben (Wagner 1975):

$$C_{ss} = K \frac{D \times t_{1/2}}{V_d \times \tau}$$

C_{ss} = Steady-state Serumspiegel, D = Erhaltungsdosis
$t_{1/2}$ = Halbwertzeit, V_d = Verteilungsvolumen,
τ = Dosierungsintervall, K = Proportionalitätsfaktor
Hieraus geht hervor, daß die Elimination eine zusätzliche, bestimmende Größe für den Steady-state Serumspiegel ist.

Im Einzelfall besteht aber eine auffällige Konstanz der Serumspiegel. Dieses wird durch die Ergebnisse bei 1o Patienten gestützt, die über mehrere Wochen eine konstante Erhaltungsdosis an Digitoxin einnahmen und bei denen die gemessenen Serumspiegel nur um durchschnittlich etwa 5 - 1o% (Variationskoeffizient) schwankten.

Dieses mögen Hinweise dafür sein, daß die genetisch festgelegte, individuell unterschiedliche Metabolisierung eine wichtige Rolle bei der Elimination spielt (Shannon et al. 1945, Vesell 1974). Der Metabolismus kann aber auch durch Krankheiten und Arzneimittel gehemmt oder stimuliert werden (Jeliffe et al. 1966, Solomon et al. 1971, Vesell 1974, Peters et al. 1975).

Nach Untersuchungen von Okita et al. (1953) und von Vöhringer und Rietbrock (1977) wird Digitoxin zu 6o - 8o% über die Nieren ausgeschieden. Dies unterstreicht die besondere Bedeutung der Nieren für die Elimination von Digitoxin. In diesem Zusammenhang ist aber die Beobachtung von Beller et al. (1971) von Interesse, daß die Einschränkung der Nierenfunktion für das Auftreten einer Digitoxinintoxikation nicht die herausragende Bedeutung hat, wie sie für das Digoxin und Strophanthin bekannt ist.

Es mußte daher pharmakokinetische Mechanismen geben, die verhindern, daß Digitoxin bei der chronischen Niereninsuffizienz vermehrt kumuliert.

Es war zu untersuchen:

1. Ob eine Absorptionsstörung für Digitoxin vorliegt.
2. Ob die Eiweißbindung von Digitoxin geändert wird.
3. Ob sich Verteilungsraum und totale Körperclearance für Digitoxin ändern.
4. Ob sich der Metabolismus von Digitoxin ändert.

Letztlich sollte untersucht werden, ob bei der chronischen Niereninsuffizienz auch eine Empfindlichkeitsänderung des Myokards gegenüber Digitalis vorliegt.

In Zusammenhang mit diesen Studien war die freie Digitoxinfraktion im Serum besonders interessant, da nach der Pharmakon-Rezeptor-Theorie das eiweißungebundene Digitoxin im Plasma an den Digitalisrezeptor gebunden werden kann. Dieser Digitalisfraktion kommt bekanntermaßen, abgesehen von der Beeinflussung der pharmakokinetischen Parameter wie Verteilungsvolumen und totaler Körperclearance, auch für die Pharmakodynamik und toxischen Nebenwirkungen wesentliche Bedeutung zu (Goldstein, Aronow und Kalman 1969, Ariens 1974, Dvorchik und Vesell 1976).

Bei unseren Untersuchungen zur Absorption von Digitoxin waren bereits 1o Minuten nach peroraler Einnahme von Digitoxintabletten bei gesunden Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz Serumdigitoxinspiegel meßbar. Das Maximum der Serumspiegel wurde nach 1 - 2 Stunden erreicht. Absorptionsgeschwindigkeit und Absorptionsrate waren bei der chronischen Niereninsuffizienz nicht signifikant beeinträchtigt. Über ähnliche Ergebnisse bei der Niereninsuffizienz berichteten Finkelstein et al. (1975) und Storstein (1973).

Für das lipophile Digitoxin erfolgt die Absorption durch passive Diffusion (Kinetik nullter Ordnung, Forth et al. 1969, Greenberger et al. 1969, Lüllmann und Peters 1973). Die Absorptionsquote beträgt für das Digitoxin 9o - 1oo% Gold 1946, Gillmann und Grosse-Brockhoff 1963, Vöhringer et al. 1977).

Für die verschiedenen Absorptionsraten der Herzglykoside ist der unterschiedliche Verteilungskoeffizient Lipid/Wasser verantwortlich. Die Wasserlöslichkeit beträgt für das Digitoxin lediglich 0,008 g/l und die Chloroformlöslichkeit 14,o g/l. Die Wasserlöslichkeit von Digoxin ist 5 mal größer und die Chloroformlöslichkeit 56 mal geringer als diejenige von Digitoxin (Peterson et al. 1977).

Die von uns verwandten Digitoxintabletten von der Firma Merck hatten in künstlichem Magensaft (DAB 7) eine Löslichkeitsrate von 95 - 1oo% nach 1 Stunde (Schwarze und Hittinger 1974). Die Löslichkeitsrate ist derjenigen von Digoxintabletten mit hoher Bioverfügbarkeit (Lanoxin^{R} Tabl.) vergleichbar, bei denen eine Löslichkeitsrate von 75% nach 1 Stunde gemessen wurde (Lindenbaum et al. 1973). Die Löslichkeitsrate wird im wesentlichen durch die Partikelgröße der Substanz in der Galenik bestimmt (Gorringe et al. 1964, Shaw 1977). Demnach ist die Absorption von der Konzentration des Herzglykosids im Darm abhängig (Forth et al. 1969, Greenberger et al. 1969). Durchblutungsgröße, Oberflächenbeschaffenheit der Darmmukosa und Darmpassagezeit sind Faktoren, die die Absorptionsrate beeinflussen (Goldfinger 1971, Heizer et al. 1971, Lüllmann und Peters 1973, Manninen et al. 1973). Unter pathologischen Bedingungen wird die Absorptionsrate von dem polaren Digoxin wesentlich stärker reduziert sein, als vom lipophilen Digitoxin (Lüllmann und Peters 1973). Inwieweit neben der passiven Diffusion auch aktive Transportmechanismen bei der Ab-

sorption von Digitoxin und Digoxin eine Rolle spielen, ist noch nicht endgültig zu beurteilen (Lauterbach 1964, 1977, Damm et al. 1975).

Neuere Untersuchungen von Beermann et al. (1971, 1972) mit tritium-markiertem Digitoxin und Digoxin unter Verwendung des nicht resorbierbaren Markers Polyäthylenglykol haben ergeben, daß die Absorption beider Herzglykoside bereits im oberen Gastrointestinaltrakt erfolgt. Beide erreichen über die Pfortader den Körperkreislauf (Oliver et al. 1971).

Durch Absorptionsstudien konnten wir nachweisen, daß Digitoxin, das unter gastroskopischer Kontrolle auf die Magenschleimhaut appliziert wurde, bereits im Magen erheblich absorbiert wird. Die Absorptionsraten sind allerdings individuell unterschiedlich. Dies könnte mit der Säurehydrolyse im Magensaft in Zusammenhang stehen, da nach unseren Untersuchungen zwischen pH 1 und 3 eine signifikante Säurehydrolyse zu hydrolytischen Metaboliten und dem Digitoxigenin stattfindet (Peters et al. 1978). Unter in-vivo Bedingungen wirkt sich die Säurehydrolyse allerdings nur bei längerer Verweilzeit von Digitalis im sauren Magensaft (z.B. Pylorusstenose und Hypersekretion) aus, da bei 77% der wegen verschiedener Magenkrankheiten untersuchten Patienten das pH im Nüchternsekret oberhalb von pH 3 liegt. Inwieweit eine Magenkrankheit die Absorptionsrate beeinflußt, ist nicht geklärt (Hall und Doherty 1971).
Der Hauptanteil von Digitoxin und Digoxin kommt im Duodenum und Jejunum zur Resorption (Beermann et al. 1971, 1972). Aber auch Ileum- und Colonschleimhaut sind in der Lage, Digoxin zu resorbieren (Ochs et al. 1975).

Da fast alle Patienten mit ausgeprägter chronischer Niereninsuffizienz hohe Dosen an kolloidalem Aluminiumhydroxid zur Verhinderung eines sekundären Hyperparathyreoidismus bzw. einer renalen Osteopathie einnehmen müssen, war es von Interesse, den Einfluß von Aludrox^{R} auf die Absorptionsrate von Digitoxin genauer zu untersuchen. Chemisch bildet Aluminiumhydroxid mit der Salzsäure im Magensaft das Aluminiumchlorid. Im Dünndarm wird Aluminiumchlorid mit dem in den Speisen vorhandenen Phosphat zu dem Aluminiumphosphat umgewandelt.

Wie unsere Untersuchungen an Probanden zeigten, wird die Absorptionsrate von Digitoxin Tabletten durch hohe Dosen von Aluminiumhydroxid nicht vermindert, obwohl in-vitro je nach Konzentration von Aluminiumhydroxid und ^{3}H-Digitoxin eine Adsorption von 55 - 98% stattfand. In-vivo stellt demnach die Adsorption an Aluminiumhydroxid kein Hindernis für die Absorption von Digitoxin dar.

Kahlil (1974) fand außerdem für Digoxin Tabletten, daß das Aluminiumhydroxid nur unwesentlich die Löslichkeit von Digoxin und damit den bestimmenden Faktor für die Absorptionsrate beeinflußt. Dagegen war die Löslichkeit von Digoxin bei Anwesenheit des Antazidums Magnesiumtrisilikat bis auf 1o% des Ausgangswertes vermindert.

Bei unseren Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium der kompensierten Retention mit niedrigen Eiweiß- und Albuminkonzentrationen war wegen der hohen Eiweißbindung des Digitoxins von 9o - 97% (Kuschinsky 1969, Lukas und de Martino 1969, Kramer et al. 1974, Peters et al. 1974, Storstein und Jansen 1976) eine Beeinflussung des Serumdigitoxinspiegels zu sehen. Rasmussen et al. (1971) konnten zeigen, daß auch rechnerische Korrekturen der Serumdigitoxin-

spiegel unter Berücksichtigung der Serum-Proteinkonzentration bei Patienten mit Niereninsuffizienz im Vergleich zu herzinsuffizienten Patienten keine erhöhten Serumdigitoxinspiegel ergaben. Sie konnten lediglich die Signifikanz der Unterschiede beseitigen.

Die Bedeutung der Eiweißbindung für die Toxizität der Digitalisglykoside ist bereits seit Jahrzehnten bekannt (Pusch 1935, Fawaz und Farah 1944). Seit den 3oer Jahren weiß man außerdem, daß bei der chronischen Niereninsuffizienz die Eiweißbindung für Farbstoffe vermindert ist (Bennhold 1938, Campion 1973, Dromgoole 1974). Neuere Untersuchungen zeigten, daß auch die Eiweißbindung von Diphenylhydantoin bei der Urämie vermindert ist (Reidenberg et al. 1971, Odar-Cederlöf und Borga 1976).

Der Einfluß der Niereninsuffizienz auf die Eiweißbindung des Digitoxins wird aber von verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt. Shoeman und Azarnoff (1972) fanden im Poolserum von Hämodialysepatienten mit der Ultrafiltrationstechnik eine Eiweißbindung des Digitoxins von 85,9 gegenüber 9o,1% bei gesunden Probanden. Eine Zugabe von Harnstoff zum Serum hatte keinen Einfluß auf die Eiweißbindung. Auch Kramer et al. (1974) berichteten über eine verminderte Eiweißbindung des Digitoxins bei Hämodialysepatienten von 88,3 gegenüber einem Normalwert von 93,7%. Storstein (1973) fand eine Erniedrigung der Eiweißbindung von Digitoxin mit der Gleichgewichtsdialyse lediglich nach Beginn der Hämodialyse und führte diesen Effekt auf die Freisetzung von freien Fettsäuren unter Heparinbehandlung zurück. In-vitro hatte Heparin keinen Einfluß auf die Eiweißbindung von Digitoxin (Storstein 1976 a). Dieser Befund steht mit denen von Rudman et al. (1971) im Einklang, die bereits vorher für verschiedene Substanzen zeigen konnten, daß

der hemmende Effekt auf die Eiweißbindung von der Konzentration der freien Fettsäuren abhängt.

Bei unseren Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war die Eiweißbindung für Digitoxin auf 95,3% gegenüber 96,9% bei herzinsuffizienten Patienten erniedrigt. Der Unterschied war in der Gruppe mit kompensierter Retention mit 94,7% deutlicher ausgeprägt. Bei diesen Patienten bestanden auch die niedrigsten Serumalbuminkonzentrationen. Allerdings war bei Einzelfällen die Eiweißbindung auch erniedrigt, wenn Eiweiß- und Albuminkonzentration im Normbereich lagen.

Nach Untersuchungen von Scholtan et al. (1966) erfolgt die Bindung von Digitalisglykosiden an Albumin und zu einem sehr geringen Anteil an das γ-Globulin. Bei der Eiweißbindung von Digitoxin handelt es sich um eine feste Bindung mit einer Assoziationskonstanten von $K = 9,62 \times 10^4$ Liter/mol (Lukas und de Martino 1969). Pro Albuminmolekül fand sich für das Digitoxin nur eine Bindungsstelle. Damit entspricht die maximale Bindungskapazität für Digitoxin der molaren Konzentration des Albumins. Bei einer Serum- Albuminkonzentration von 35,o g/l können demnach etwa 39o mg Digitoxin in 1 Liter Plasma gebunden werden. Die Bindungskapazität übertrifft somit um etwa das 1ooofache die mittlere Wirkdosis von 1,1 mg.

Nach Lukas und de Martino (1969) und Scholtan et al. (1966) wird die Eiweißbindung von Digitoxin im wesentlichen durch die Albuminkonzentration bestimmt. Änderungen des pHs in einem Bereich von 6 - 9 hatten keinen Einfluß auf die Eiweißbindung von Digitoxin.

Gugler et al. (1973, 1975, 1976) konnten zeigen, daß ab einer Albuminkonzentration von 3,o g% und einer Kreatinin-

clearance von 5o ml/min die Eiweißbindung der stark eiweißgebundenen Substanzen Phenytoin und Clofibrat erniedrigt sind.

Neben der Erniedrigung der Serum- Albuminkonzentration werden bei der Urämie aber auch inhibierende Stoffwechselprodukte oder atypische Albuminmoleküle für die erniedrigte Eiweißbindung angeführt (Shoeman und Azarnoff 1972, Odar-Cederlöf und Borga 1976). Hierbei könnte es zu einer kompetitiven Hemmung der Eiweißbindung kommen, ähnlich dem Effekt, der für verschiedene, stark eiweißgebundene Medikamente (Phenylbutazon, Warfarin, Tolbutamid, einige Sulfonamide und Clofibrat) bei extrem hohen therapeutischen Dosen beschrieben wurde (Solomon und Abrams 1972). Einige dieser inhibierenden Faktoren sind nach Untersuchungen von Andreasen (1974) dialysierbar.

Die Messung der eiweißungebundenen Digitoxinkonzentration im Serum ergab bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz lediglich eine geringe Erhöhung auf 0,9 $\pm$ 0,4 ng/ml gegenüber 0,8 $\pm$ 0,3 ng/ml bei herzinsuffizienten Patienten. Eine Übertragung der Befunde über die verminderte Eiweißbindung auf die Verhältnisse im Gesamtorganismus ist daher nicht möglich, da sonst die freie Digitoxinkonzentration im Serum nicht um 16% sondern um 61% ansteigen würde.

Im Pseudoäquilibrium und unter Steady-state Bedingungen lassen sich die pharmakokinetischen Parameter wie Eliminationshalbwertzeit, Verteilungsvolumen und totale Körperclearance anhand des Ein-Kompartment-Modells mit ausreichender Genauigkeit errechnen (Storstein 1976 b). Nach der von Wagner (1975) angegebenen Formel hängt die Eliminationshalbwertzeit vom Verteilungsvolumen und der totalen Körperclearance ab.

$$t_{1/2} = \frac{V_d}{Cl_{tot}} \times 0{,}693 \text{ (Wagner 1975)}$$

Im Gegensatz zu Digoxin und seinen Derivaten, die bei chronischer Niereninsuffizienz vermindert eliminiert werden (Bloom und Nelp 1966, Marcus et al. 1966 a, Doherty 1968, Kramer und Scheler 1972, Grosse-Brockhoff et al. 1973, Grabensee et al. 1977), zeigt die Eliminationshalbwertzeit von Digitoxin bei ausgeprägter chronischer Niereninsuffizienz mit 5,7 Tagen gegenüber 7,6 Tagen bei gesunden Probanden eine signifikante Erniedrigung. Die Elimination erfolgt dabei nach einer einfachen Exponentialfunktion (Kinetik 1. Ordnung).

In der Literatur werden für die Serumhalbwertzeiten von Digitoxin verschiedene Werte angegeben. Kramer et al. (197o) fanden für ^{3}H-Digitoxin bei herzinsuffizienten Patienten eine solche von 8,2 Tagen und bei chronischer Niereninsuffizienz von 9,3 Tagen. Vöhringer et al. (1976) konnten bei herz- und niereninsuffizienten Patienten keine unterschiedlichen Halbwertzeiten für ^{3}H-Digitoxin messen. Storstein (1974) und Gjerdrum (1972) geben bei herzinsuffizienten Patienten mit der ^{86}Rb Hemmethode 8,1 bzw. 6,8 Tage und Leach et al. (1966) mit der Doppelisotopenmethode 4,3 - 6,4 Tage an. Bei chronischer Niereninsuffizienz war bei Storstein (1974 a) ebenso wie bei uns die Serumhalbwertzeit von Digitoxin verkürzt. Sie lag allerdings in dieser Studie mit 3,9Tagen deutlich niedriger. Die Unterschiede in den Halbwertzeiten beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlichen Meßtechniken. So sind die Halbwertzeiten von ^{3}H-Digitoxin nicht vergleichbar mit denen mit mehr oder weniger spezifischen Meßmethoden ermittelten Halbwertzeiten von unmarkiertem Digitoxin, da auch alle wasserlöslichen Metaboliten in die Messung eingehen.

Die Serumhalbwertzeiten können bei chronischer Niereninsuffizienz in Einzelfällen sogar niedriger liegen als die entsprechenden Serumhalbwertzeiten für das Digoxin (Doherty et al. 1964, Kramer et al. 197o, Grabensee et al. 1977).

In Zusammenhang mit der Elimination ist das fiktive Verteilungsvolumen von Digitoxin eine wichtige Größe. Das fiktive Verteilungsvolumen V_d wurde aus der intravenös verabreichten Dosis und der im halblogarithmischen System durch Extrapolation der terminalen Eliminationsgeraden auf die y-Achse ermittelten Digitoxinkonzentrationen errechnet. Hierbei wurde ein Ein-Kompartment-Modell angenommen, da die Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve während der Verteilungsphase gegenüber der Gesamtfläche unter der Eliminationskurve vernachlässigt werden kann (Storstein 1976 b). Das V_d betrug im Pseudoäquilibrium bei Probanden und Patienten mit ausgeprägter Niereninsuffizienz 32,2 $\pm$ 3,1 l bzw. 3o,3 $\pm$ 7,2 l. Obwohl das Verteilungsvolumen von Digitoxin bei der chronischen Niereninsuffizienz geringfügig kleiner als bei Probanden ist, waren die Unterschiede nicht signifikant. Auch die Verteilungskinetik von Digitoxin zeigt für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gegenüber Probanden keine Unterschiede. Das fiktive Verteilungsvolumen im Steady-state lag bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Mittel bei 4o,7 l (Körpermenge = 1,1 mg, tägl. Dosis O,1 mg Digitoxin p.o., Abb. 45). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurde bei der gleichen Digitoxindosis und einer entsprechenden Körpermenge von O,8 mg Digitoxin ein mittleres fiktives Verteilungsvolumen von 34,4 l errechnet (Abb. 46). Das Verteilungsvolumen für Digitoxin ist demnach bei chronischer Niereninsuffizienz nicht größer sondern eher kleiner als bei gesunden Probanden.

Bei gleichem Verteilungsvolumen weist die Verkürzung der Serumhalbwertzeit von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz darauf hin, daß die totale Körperclearance von Digitoxin entsprechend erhöht ist:

$$Cl_{tot} = k_e \times V_d$$

Dies wirkt sich vor allem auf die metabolische Clearance von Digitoxin aus, da die renale Clearance bei chronischer Niereninsuffizienz vermindert ist (Abb. 48, 49).

Bei der ausgeprägten chronischen Niereninsuffizienz fanden wir Werte für die renale Clearance und renale Exkretion von Digitoxin, die um mehr als 5o% gegenüber Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz reduziert waren. Unter einer konstanten Dosierung wurden bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 12,1% der täglichen Digitoxindosis gegenüber 26,4% bei der Kontrollgruppe als Digitoxin und immunreaktive Metaboliten im Urin ausgeschieden. Storstein (1974 a) fand hierfür mit der ^{86}Rb-Hemmethode 13,6% gegenüber 32,9% bei der Kontrollgruppe.

Lukas und Peterson (1966) wiesen mit der spezifischen Doppelisotopenmethode bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz 8,3 - 3o,3% (im Mittel 15,8%) der täglichen Dosis im 24-h-Urin nach. Bei zwei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war der renale Exkretionswert von Digitoxin deutlich erniedrigt.

Nach unseren Untersuchungen mit ^{3}H-Digitoxin werden bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz (nach einmaliger intravenöser Injektion) 4,4% der Körpermenge am ersten Tag und 21,2% bis zum siebten Tag bzw. bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 1,2% am ersten Tag und

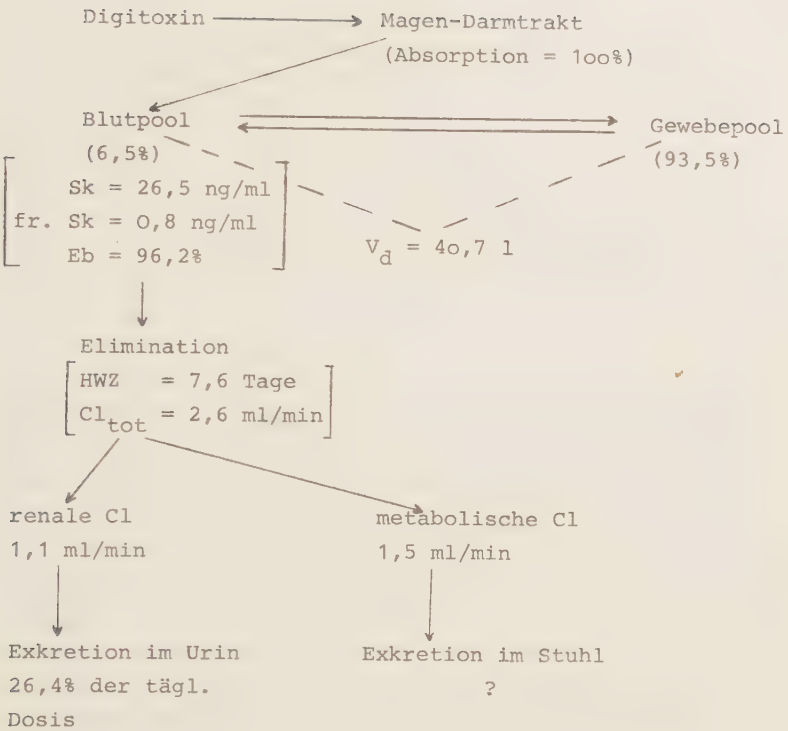


Abb. 48: Pharmakokinetische Daten von Digitoxin bei Probanden und Patienten mit Herzinsuffizienz.
Erhaltungsdosis = 0,1 mg Digitoxin/die
Körpermenge an Digitoxin = 1,1 mg
Plasmavolumen = 2,7 l

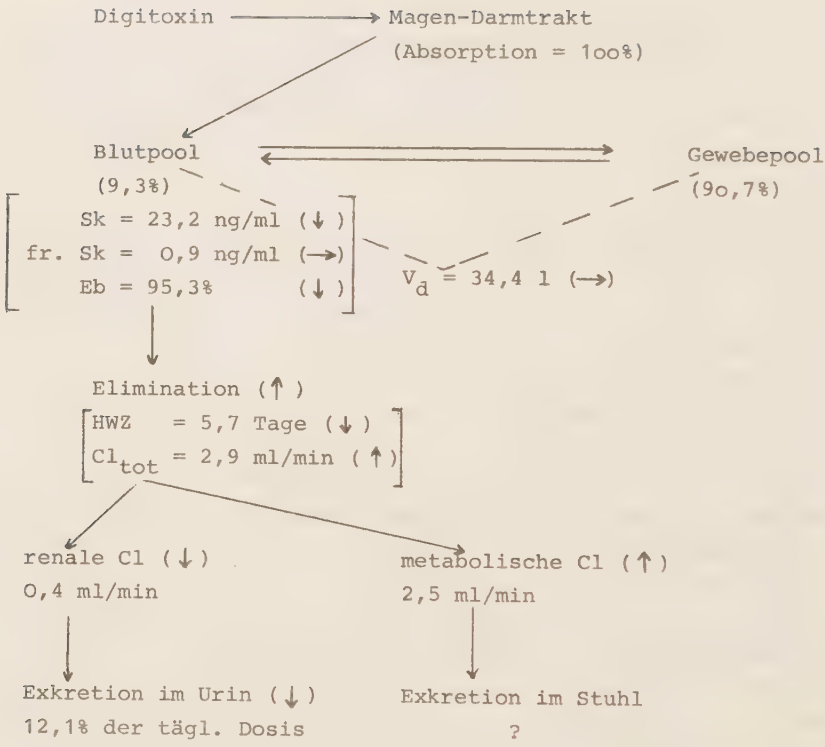


Abb. 49: Pharmakokinetische Daten von Digitoxin bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.
Erhaltungsdosis = 0,1 mg Digitoxin/die
Körpermenge an Digitoxin = 0,8 mg
Plasmavolumen = 3,2 l
(→), (↑), (↓): nicht signifikante Änderung, signifkante Erhöhung, signifikante Erniedrigung gegenüber Probanden und Patienten mit Herzinsuffizienz.

7% bis zum siebten Tag im 24-h-Urin ausgeschieden. Die renalen Exkretionswerte für ^{3}H-Digitoxin stimmen bei Patienten mit Herzinsuffizienz mit denen von Lahrtz et al. (1969), Kramer und Scheler (1972) und Vöhringer (1978) weitgehend überein.

Unter Steady-state Bedingungen werden bei herzinsuffizienten Patienten täglich etwa 2,4% und bei Patienten mit ausgeprägter Niereninsuffizienz etwa 1,o - 1,5% der Körpermenge an Digitoxin im Urin nachgewiesen.

Bei Patienten, die einer Dialysebehandlung unterzogen werden, spielen intermittierende Hämodialyse und Peritonealdialyse bei der Elimination von Digitoxin nur eine unbedeutende Rolle, da nicht mehr als 1/14 derjenigen Menge aus dem Körper entfernt wird, die normalerweise im Urin gefunden wird (Kramer et al. 1972).

Die fehlende toxische Kumulation von Digitoxin bei verminderter renaler Exkretion läßt die Annahme zu, daß bei der chronischen Niereninsuffizienz kompensatorisch eine verstärkte Exkretion über den Stuhl erfolgt. Lahrtz et al. (1969) und Lukas und Peterson (1966) konnten zwar keine erhöhte Exkretion über den Stuhl nachweisen, es wurden aber die wasserlöslichen Metaboliten des Digitoxins nicht berücksichtigt.

Neuere Untersuchungen unter Einschluß der wasserlöslichen Metaboliten erbrachten jedoch bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz eine deutliche anteilmäßige Steigerung der Ausscheidung von Digitoxin im Stuhl von 41,4% auf 72,5%, wobei die Gesamtexkretion über die Nieren und den Stuhl derjenigen von gesunden Patienten entsprach (Vöhringer 1978). Danach gibt es für das Digitoxin einen alternativen Exkretionsmechanismus über den Stuhl bei

verminderter renaler Exkretion. Marcus et al. (1966 a) fanden bei der chronischen Niereninsuffizienz für das Digoxin auch eine Steigerung der biliären Exkretion, vor allem der wasserlöslichen Metaboliten. Sie reichte jedoch nicht aus, um eine toxische Anhäufung von Digoxin zu vermeiden.

Digitoxin und seine kardioaktiven und wasserlöslichen Metaboliten werden über die Galle ausgeschieden. Wenn es zutrifft, daß der enterohepatische Kreislauf eine wesentliche Rolle bei der langen Wirkung von Digitoxin spielt (Okita 1967, Caldwell und Greenberger 1971, Storstein 1975), dann wäre es vorstellbar, daß bei der chronischen Niereninsuffizienz der enterohepatische Kreislauf von Digitoxin und seinen Metaboliten behindert wird. Auch daraus würde sich eine erhöhte Exkretion über den Stuhl erklären lassen. Allerdings gibt es hierfür und für verstärkte enterale Sekretionsmechanismen, wie sie von Lauterbach (1977) diskutiert wurde, bisher keine eindeutigen Hinweise.

Als Ursache für die erniedrigten Serumdigitoxinspiegel bei chronischer Niereninsuffizienz wird ein verstärkter Metabolismus in der Leber erwogen (Lukas und Peterson 1966, Storstein 1973).

Unsere Untersuchungen unter Verwendung von ^{3}H-Digitoxin erbrachten bei niereninsuffizienten Patienten einen signifikanten Anstieg der wasserlöslichen Metabolitenfraktion des Urins mit längerer Verweilzeit im Organismus von 19,6 $\pm$ 7,0% am ersten Tag auf 36,9 $\pm$ 8,9% am siebten Tag, was auf einen verstärkten Metabolismus hindeutet. Dagegen wurde ein solcher Anstieg bei Patienten mit Herzinsuffizienz, bei denen die wasserlöslichen Metaboliten 29,6 $\pm$ 12,6% betrugen, nicht beobachtet. Die Unterschiede waren allerdings vermutlich wegen der geringen Fallzahl nicht signifikant. Bei der dünnschichtchromatographischen

Auftrennung der dichlormethanlöslichen Metaboliten im Urin fanden wir gegenüber Patienten mit Herzinsuffizienz keine wesentlichen Unterschiede. Als kardioaktive Substanz konnte lediglich Digitoxin identifiziert werden. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu denen von Frau Storstein (1973), die bei der chronischen Niereninsuffizienz vermehrt hydrolysierte und 12-ß-hydroxylierte Metaboliten des Digitoxins nachwies. Sie werden aber durch die Befunde von Lahrtz et al. (1969), Vöhringer et al.(1977, 1978) und Kramer et al. (1977) gestützt.

Obwohl in der Literatur eine Reihe von Metaboliten des Digitoxins beschrieben wurden (Okita et al. 1955, 1964, Ashley et al. 1958, Storstein 1973, 1977 a, Vöhringer und Rietbrock 1974, 1977), ist es bisher nicht eindeutig gelungen, die einzelnen Schritte der Metabolisierung aufzuzeigen. Die Metabolisierung von Digitoxin läuft nach zahlreichen neueren Studien wesentlich geringer ab, als bisher angenommen wurde (Lahrtz et al. 1969, Kramer et al. 197o, Vöhringer und Rietbrock 1974, Bodem et al. 1975, Peters et al. 1975, Wirth et al. 1976). Die Schwierigkeiten der Identifizierung von Metaboliten sind wegen der geringen Konzentrationen bisher mit keinem Verfahren befriedigend gelöst worden. Bei Tierversuchen an der Ratte, die als bevorzugtes Versuchstier zum Studium des Metabolismus von Digitoxin gilt, konnten folgende Abbauwege aufgedeckt werden (Repke et al. 1959, 1959a, 1963, Rietbrock und Vöhringer 1974):

1. 12-ß-Hydroxylierung
2. enzymatische Hydrolyse
3. Konjugation
4. Epimerisierung der 3-ß-Hydroxylgruppe

Ashley et al. (1958) war es erstmalig gelungen, beim Menschen im Urin die 12-ß-Hydroxylierung von Digitoxin zum Digoxin nachzuweisen. Der hohe Anteil von etwa 5o - 6o% Hydroxylierungsprodukten des Digitoxins bei der Ratte (Repke et al. 1959) hat dazu geführt, dieser Metabolitengruppe auch beim Menschen besondere Beachtung beizumessen. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch, daß der Anteil der 12-ß-Hydroxylierungsprodukte beim Menschen weniger als 1o% ausmacht (Solomon et al. 1971, Storstein 1973, Peters et al. 1975, Kramer et al. 1977, Vöhringer und Rietbrock 1977). Die enzymatische Hydrolyse bis zum Digitoxigenin stellt dagegen einen konstant nachweisbaren Abbauschritt dar. Allerdings ist hierbei auch zu bedenken, daß die glykosidischen Metaboliten durch Säurehydrolyse im Magen entstanden sein können (Beermann et al. 1971, Peters et al. 1978). Im Plasma und Urin erscheinen in geringen Konzentrationen Digitoxigeninbisdigitoxosid und im Stuhl anteilmäßig etwa 2o% Digitoxigeninmonodigitoxosid (Vöhringer und Rietbrock 1977, Vöhringer 1978).
Die Epimerisierung der 3-ß-Hydroxylgruppe in die 3 α Stellung ist an eine gekoppelte Enzymreaktion, die vornehmlich in den Lebermikrosomen abläuft, gebunden und führt zum Verlust an Kardioaktivität des Genins (Repke und Samuels 1964, Repke und Portius 1965).

Diese Enzymreaktion ist beim Menschen im Gegensatz zur Ratte nur in geringem Ausmaß nachweisbar (Rietbrock et al. 1977, Vöhringer 1978). Ein limitierender Faktor scheint hierfür die nur langsam ablaufende Enzymhydrolyse bis zum Digitoxigeninmonodigitoxosid zu sein.

Der bedeutendste metabolische Schritt liegt in der Inaktivierungsreaktion zur Wasserlöslichkeit. Hierbei könnte die Oxydation des Steroidkerns, eventuell gekoppelt mit

der Konjugation, aber auch die Verseifung des Laktonringes eine Rolle spielen (Grosse-Brockhoff und Hausamen 1975, Benthe 1977). Die 12-ß-Hydroxylierung ist ebenso wie eine Reihe von Konjugationsreaktionen an die Anwesenheit der NADPH- abhängigen, mikrosomalen Enzymsysteme gebunden. Eine dieser Konjugationsreaktionen besteht in der Kopplung mit Glukuronsäure oder Schwefelsäure, wobei es sich um eine endergonische Reaktion handelt (Netter 1972). Diese Enzymreaktion beruht auf einer Aktivierung der Glukuronyltransferase und läßt sich durch zahlreiche Medikamente, wie z.B. Phenobarbital und Rifampicin, die als Induktoren des mikrosomalen Enzymsystems gelten, steigern (Jeliffe und Blankenhorn 1966, Mandel 1971, Solomon et al. 1971, Peters et al. 1975).

Als Konjugationsprodukte konnten Vöhringer und Rietbrock (1977) vorwiegend das Digitoxin und Monodigitoxosid und in geringen Mengen auch das 3-ﾒ-Digitoxigenin im Urin nachweisen. Der größte Anteil der wasserlöslichen Metaboliten von etwa 80% ist jedoch nicht identifiziert (Vöhringer und Rietbrock 1974).

Neuste Ergebnisse zum Metabolismus von Digitoxin bei der chronischen Niereninsuffizienz (Bodem et al. 1977, Klehr et al. 1977) weisen darauf hin, daß die Dihydrierung des Laktonringes beim Digitoxin ähnlich wie beim Digoxin (Watson et al. 1973) ein weiterer Schritt im metabolischen Abbau von Digitoxin darstellt.

Abschließend soll noch auf die Frage des therapeutischen Bereichs von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz eingegangen werden.

Klinische Kontrollen vieler Patienten zeigten, daß sich eine kardiale Insuffizienz bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mit Digitoxin rekompensieren läßt.

Bei einer Dosierung von 0,1 mg Digitoxin/die waren wir niemals gezwungen, die Dosis wegen Intoxikationserscheinungen zu ändern. Bei einigen Patienten, bei denen die Dosis auf 0,15 mg/die erhöht wurde, traten allerdings Intoxikationserscheinungen auf.

Unsere Ergebnisse zur herzdynamischen Wirkung von Digitoxin mit Hilfe der systolischen Zeitintervalle, weisen darauf hin, daß bei einigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vornehmlich im Stadium der dekompensierten Retention eine verminderte Ansprechbarkeit des Myokards vorliegt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Kramer et al. (1977 a) beim Digoxin gemacht.
Das geringere Ausmaß der kardialen Wirkung von Digitoxin bei einzelnen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im präurämischen Stadium beruht nach unseren Untersuchungen nicht auf Differenzen in der Verteilungskinetik von Digitoxin, sondern möglicherweise auf Änderungen der Affinität des spezifischen Digitalisrezeptor. Ob dieser Rezeptor membrangebunden oder intrazellulär liegt, ist für diese Frage nicht entscheidend (Kalman und Okarma 1974).

Das offene Zwei-Kompartment-Modell gilt als einfachstes Modell, das die Beziehung zwischen Serumdigitalisspiegel und kardialem Effekt erklären kann (Reuning et al. 1973, Wagner 1975). Dabei erfolgt die Elimination allein aus dem zentralen Kompartiment. Das zentrale Kompartiment macht für Digoxin nur 1% und für Digitoxin nur 5 - 7% der Summe der beiden Kompartimente aus. Zu dem peripheren Kompartiment gehört die Herzmuskulatur mit einem spezifischen oder Rezeptoranteil und einer unspezifischen, digitalisbindenden Gewebestruktur(Kuschinsky et al. 1967, Kuschinsky und van Zwieten 1969). Der verzögerte kardiale Effekt von Digitoxin nach intravenöser Gabe, wie wir ihn bei Probanden und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz mit einem maximalen Effekt nach 2 - 4 Stunden gemessen haben, findet in den Kinetiken zwischen den beiden Kompartimenten seinen Ausdruck.

Es läßt sich bisher nicht entscheiden, ob es sich bei der in Einzelfällen nachweisbaren, verminderten Ansprechbarkeit des Myokards gegenüber Digitalis bei der chronischen Niereninsuffizienz um eine primär kardiale Empfindlichkeitsänderung aufgrund der Urämie, oder um die Auswirkung von Elektrolytverschiebungen wie Hyperkaliämie und Hypocalcämie handelt. Daß eine Hyperkaliämie zu einer Empfindlichkeitsminderung führt, ist seit den Tierversuchen an Hunden (Marcus et al. 1969) und den experimentellen Bindungsstudien von Tritiummarkiertem Ouabain an kardiale Na^+, K^+ Membran-ATPase (Matsui und Schwartz 1966, Erdmann et al. 1976) bekannt. Dutta und Marks (1969) fanden zusätzlich, daß eine Hyperkaliämie am perfundierten Meerschweinchenherzen zu einer verminderten Aufnahme von Oubain ins Gewebe und auch in die Mikrosomenfraktion führt. Die Bedeutung der metabolischen Azidose ist in diesem Zusammenhang noch ungeklärt.

Bei unseren Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war im Mittel die Kaliumkonzentration im Serum erhöht. Allerdings lag bei einigen der Patienten, die auf Digitoxin weniger gut ansprachen, das Kalium im Serum noch im oberen Normbereich, so daß wahrscheinlich noch andere, bisher unbekannte, möglicherweise dialysierbare Faktoren eine Rolle spielen. Hierfür würde die Beobachtung sprechen, daß Patienten nach Beginn der Dauerdialyse mit der normalen Erhaltungsdosis von Digitoxin kompensiert sind. Um dies zu klären, sind jedoch noch weitere Untersuchungen mit Langzeitbeobachtungen vor und nach Dialysebehandlung notwendig.

6.3. Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose

Seit den Untersuchungen von Okita et al. (1955) und den Tierexperimenten von Repke (1963) ist bekannt, daß die Leber eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Digitoxin spielt. Vöhringer (1978) fand, daß 41,4% des ^{3}H-Digitoxins normalerweise über den Stuhl ausgeschieden werden. Der biliären Exkretion von Digitoxin kommt daher für die Elimination erhebliche Bedeutung zu.
Erst seit einigen Jahren wandte man sich den vielfältigen biologischen Faktoren zu, die bei Lebererkrankungen Einfluß auf die Kinetik von Pharmaka nehmen (Wilkinson und Schenker 1975, Klotz et al. 1975, Blaschke 1977). Leberfu nktionsstörungen führen bei zahlreichen Medikamenten wie Antipyrin, Lidocain, Diazepam und Hexobarbital zu einer verzögerten Ausscheidung (Thomson et al. 1973, Klotz et al. 1975, Breimer et al. 1975, Andreasen et al. 1976). Trotzdem sind nicht für alle Pharmaka Auswirkungen auf die Pharmakokinetik zu erwarten (Wilkinson und Schenker 1975). Eines dieser Pharmaka ist das Digoxin, dessen Stoffwechsel durch eine Leberfunktionsstörung , wie sie bei der Leberzirrhose und akuten Hepatitis besteht, nicht wesentlich beeinflußt wird (Marcus et al. 1964, Zilly et al. 1975, 1978).

Bisherige Studien zum Stoffwechsel von Digitoxin bei Lebererkrankungen wurden vorwiegend mit Tritium-markiertem Digitoxin durchgeführt (Lahrtz et al. 1969, Zilly et al. 1976). Es ist hieraus nicht zu entnehmen, ob es bei Lebererkrankungen zu einer toxischen Kumulation von Digitoxin kommt, da die Untersuchungen nicht unter Steady-state Bedingungen durchgeführt wurden und so eine Aussage über die eiweißungebundene Digitoxinkonzentration im Serum nicht möglich war.

Lukas (1973 a) untersuchte mit der Doppelisotopenmethode bei einem Patienten mit Leberzirrhose die Kinetik von Digitoxin unter Steady-state Bedingungen. Er fand, ebenso wie Zilly et al. (1976), die ^{3}H-Digitoxin verwandten, eine Erniedrigung der Eiweißbindung von Digitoxin. Zusätzlich war die Serumhalbwertzeit für Digitoxin auf 7,5 Tage gegenüber 4,3 - 6,4 Tagen bei herzinsuffizienten Patienten verlängert. Die Serumdigitoxinkonzentration war erniedrigt, während die freie Digitoxinfraktion im Serum um 19% erhöht war.

Es war das Ziel dieser Arbeit, den Stoffwechsel von Digitoxin an einem größeren Krankengut mit Leberzirrhose unter Steady-state Bedingungen mit einem Radioimmunoassay zu untersuchen. Methodisch war besonders wichtig, Interferenzen des Bilirubins mit dem Radioimmunoassay zu erkennen und entsprechend zu berücksichtigen (s. Kapitel 3.3.5.).

Wir fanden bei Patienten mit Leberzirrhose unter einer peroralen Erhaltungsdosis von 0,1 mg Digitoxin/die eine mittlere Serumdigitoxinkonzentration von 18,4 $\pm$ 3,1 ng/ml und bei der Kontrollgruppe mit alleiniger Herzinsuffizienz von 22,8 $\pm$ 8,6 ng/ml. Die Serumdigitoxinspiegel unterschieden sich nicht signifikant. Dagegen war die freie Digitoxinkonzentration im Serum bei Patienten mit einer Leberzirrhose um 88% auf 1,5 $\pm$ 0,7 ng/ml gegenüber 0,8 $\pm$ 0,3 ng/ml erhöht. Sie lag bei 6 von 9 Patienten höher als 1,5 ng/ml und bei 3 Patienten höher als 2,0 ng/ml.

Die Erhöhung der eiweißungebundenen Digitoxinfraktion im Serum beruht auf einer signifikant erniedrigten Eiweißbindung von Digitoxin. Sie betrug bei unseren Patienten mit Leberzirrhose 91,9%.

Die Ursache der erniedrigten Eiweißbindung von Digitoxin bei Lebererkrankungen ist nicht völlig geklärt. Nach Lukas (1973 a) ist sie auf eine niedrige Albuminkonzentration im Serum zurückzuführen, während Zilly et al. (1976) auch dem Bilirubin eine hemmende Wirkung auf die Eiweißbindung von Digitoxin zuschreiben. Wir fanden erniedrigte Werte für die Eiweißbindung von Digitoxin sowohl bei Patienten mit erniedrigter als auch normaler Albuminkonzentration und auch bei Patienten mit normalem Bilirubingehalt im Serum.
Daher kommt für die verminderte Eiweißbindung das Vorhandensein von abnormen Albuminmolekülen oder interferierenden Substanzen an den Albuminbindungsstellen des Digitoxins ähnlich wie bei der chronischen Niereninsuffizienz in Betracht (Blaschke 1977).

Die mittlere Serumeliminationshalbwertzeit von Digitoxin betrug bei unseren Patienten mit Leberzirrhose 7,9 Tage. Sie unterschied sich nicht gegenüber derjenigen von gesunden Probanden. Die Einzelwerte zeigten aber eine größere Streuung.

Der Körperbestand an Digitoxin ist nach diesen Befunden bei Patienten mit Leberzirrhose gegenüber Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz bei der gleichen Erhaltungsdosis nicht unterschiedlich, da die globalen Eliminationskonstanten übereinstimmen.

Als Folge der erniedrigten Eiweißbindung von Digitoxin und der erhöhten eiweißungebundenen Digitoxinfraktion waren die renale Exkretion von Digitoxin und seinen immunreaktiven Metaboliten um 63% und die renale Clearance um 45,5% im Vergleich zu Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht. Zusätzlich war bei unseren Patienten mit Leberzirrhose das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium mit 65 l und im Äquilibrium mit 6o l größer als bei der Kontrollgruppe.

Die Verteilungskinetik von Digitoxin zeigt dagegen bei Leberzirrhose im Vergleich zu Probanden keine Differenzen.

Bei einem Patienten mit einem Aszites von etwa 1o Litern fanden sich in diesem Kompartiment 1,1% der Körpermenge an Digitoxin, während sich zur gleichen Zeit 3,o% der Körpermenge im Plasma befanden. Der Aszites bei Leberzirrhose kann daher als ein Verteilungsraum von Digitoxin angesehen werden. Dieses könnte auf der relativ hohen Eiweißkonzentration im Aszites beruhen, die wir bei unserem Patienten mit 2,5 g% gemessen haben. Unsere Ergebnisse bestätigen insofern diejenigen von Zilly et al. (1976), die bei ihren Patienten mit einer Leberzirrhose ebenfalls ein vergrößertes Verteilungsvolumen von ^{3}H-Digitoxin fanden.

Aus unseren Befunden ergibt sich, daß die totale Körperclearance von Digitoxin auf 3,7 ml/min gegenüber 2,6 ml/min bei Probanden deutlich erhöht ist (Abb. 48, 5o).

Bei der Leberzirrhose reichen somit die Eliminationsmechanismen, wie erhöhte renale Exkretion und Vergrößerung des Verteilungsraumes vielfach nicht aus, um eine verstärkte Kumulation des freien Digitoxins im Serum zu verhindern. Diesem Befund kommt vermehrte Bedeutung zu, da häufig eine Hypokaliämie aufgrund eines Hyperaldosteronismus besteht, die zu einer verminderten Digitalistoleranz führt. Die Ursache könnte in einer verminderten Exkretion von Digitoxin und seinen Metaboliten im Stuhl liegen. Lukas (1973 a) wies außerdem darauf hin, daß bei der Leberzirrhose der Metabolismus von Digitoxin vermindert ist. Im Gegensatz hierzu stehen die Befunde von Zilly et al. (1976), die vermehrt wasserlösliche Metabolite des Digitoxins im Urin nachwiesen.

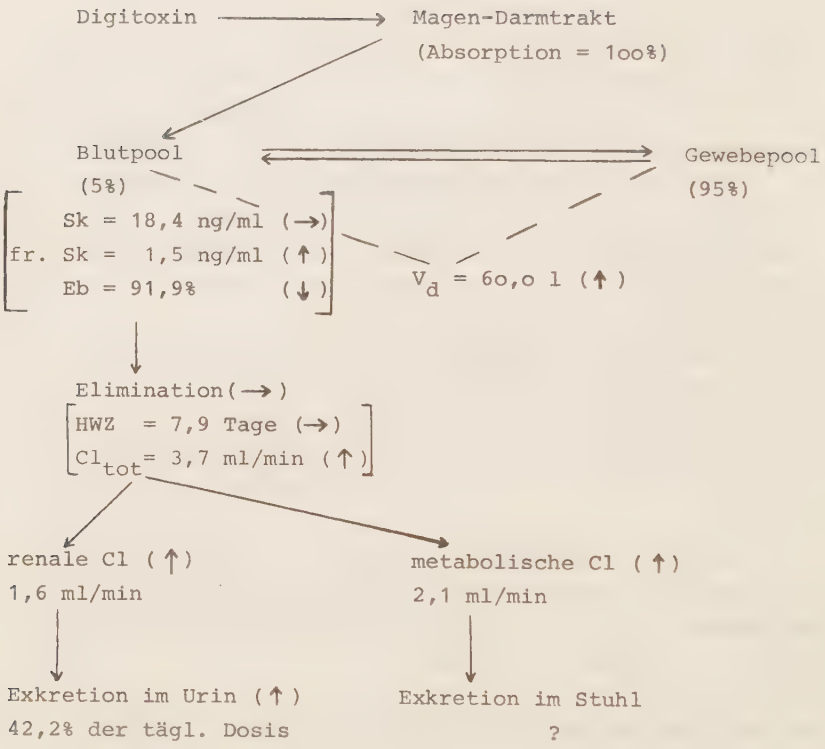


Abb. 5o: Pharmakokinetische Daten von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose.
Erhaltungsdosis = O,1 mg Digitoxin/die
Körpermenge an Digitoxin = 1,o4 mg
Plasmavolumen = 2,7 l
(→), (↑), (↓): nicht signifikante Änderung, signifikante Erhöhung, signifikante Erniedrigung gegenüber Probanden und Patienten mit Herzinsuffizienz.

Der Vergleich mit der chronischen Niereninsuffizienz zeigt, daß sich die erniedrigte Eiweißbindung von Digitoxin recht unterschiedlich auf die Pharmakokinetik von Digitoxin auswirkt und das Ausmaß letztlich nicht vorhersehbar ist (Blaschke 1977). Unsere Untersuchungen ließen aber auch erkennen, daß die Stoffwechseländerungen von Digitoxin bei der Leberzirrhose gänzlich anders sind als bei der chronisch aktiven Hepatitis, bei der von Storstein und Amlie (1975) eine beschleunigte Elimination von Digitoxin mit einer Serumhalbwertzeit von 4,4 Tagen gegenüber 8,1 Tagen bei der Kontrollgruppe gemessen wurde.

6.4. Untersuchungen zum Stoffwechsel von Digoxin

Der Stoffwechsel von Digoxin war in den letzten Jahren Ziel intensiver Forschung. Unsere Untersuchungen befaßten sich im wesentlichen mit dem Metabolismus des Digoxins und insbesondere mit der Gruppe der dihydrierten Metaboliten. Obwohl eine Reihe von Metaboliten inzwischen entdeckt wurde (Marcus et al. 1966, 1966 a, Luchi und Gruber 1968, Watson et al. 1973, Clark und Kalman 1974, Greenwood et al. 1975, Rietbrock et al. 1977), wird von vielen Arbeitsgruppen bis zum heutigen Tage behauptet, daß Digoxin in unveränderter Form renal eliminiert wird (Doherty et al. 1971, 1973 a, Bodem et al. 1974, Moe und Farah 1975). Nach unserer Ansicht sind diese Diskrepanzen auf methodische Gründe zurückzuführen (Peters und Kalman 1978).
Nachdem von Luchi und Gruber (1968), Watson et al. (1973) und Clark und Kalman (1974) die Gruppe der dihydrierten Metaboliten des Digoxins entdeckt wurde , scheint diese Feststellung in dieser Form nicht mehr zu gelten. Diese bis-

her unbekannte Gruppe von Metaboliten ist insofern von besonderem Interesse, da es sich um kardioinaktive Metaboliten handelt. Dihydrodigoxin besitzt nur 1/7 - 1/22 der Kardioaktivität des Digoxins (Bach und Reiter 1964, Lage und Spratt 1966, Okarma et al. 1972, Vick et al. 1957). Die Entdeckung erfolgte mit Hilfe der Gaschromatographie mit Elektroneneinfangdetektor und die Identifizierung wurde mit der Massenspektrographie durchgeführt. Bei Untersuchungen zur Häufigkeit dieser Metabolitengruppe konnten Clark und Kalman (1974) einen Anteil von 13% dihydrierter Metaboliten des Digoxins in der lipidlöslichen Phase des Urins nachweisen. Greenwood et al. (1975) bestätigten massenspektrometrisch die Anwesenheit von dihydrierten Metaboliten und fanden einen mittleren Anteil von 16% im Urin. Die Identifizierung von dihydrierten Metaboliten des Digoxins gelang auch im Blut (Clark und Kalman 1974). Der Gaschromatograph mit Elektroneneinfangdetektor war für diese Untersuchungen mit einer Nachweisempfindlichkeit von etwa 2oo pg empfindlich genug und bot zusätzlich die Vorteile der spezifischen Trennung von nichthydrierten und dihydrierten Metaboliten.
Bisherige Metabolitenstudien des Digoxins wurden mit 12 α ^{3}H-Digoxin und dünnschichtchromatographischer Auftrennung in verschiedenen Fließmittelsystemen durchgeführt. Hiermit war eine Abtrennung der dihydrierten Metaboliten nicht möglich. Das einzige dünnschichtchromatographische System, das hierzu in der Lage ist, wurde von Rabitsch (1969) beschrieben. Es wurde aber für Metabolitenstudien nicht angewandt. Neuerdings gelang auch eine solche Trennung mit der Säulenchromatographie auf DEAE Sephadex LH 2o (Sugden et al. 1976, Gault et al. 1976).

Es war das Ziel dieser Arbeit, eigene Ergebnisse zum Metabolismus von Digoxin vorzulegen, die in Zusammenarbeit

mit der Arbeitsgruppe um Kalman in Stanford durchgeführt wurden. Sie war im wesentlichen darauf abgezielt, aufzuzeigen:

1. Ob die Bildung und Exkretion von dihydrierten Metaboliten des Digoxins von der Digoxindosis, der Applikationsart oder vom Serumdigoxinspiegel abhängt.
2. Ob die Bildung und Exkretion von dihydrierten Metaboliten des Digoxins durch Medikamente oder Krankheiten, z.B. die chronische Niereninsuffizienz beeinflußt wird.
3. Ob es bestimmte Patientengruppen gibt, die eine besonders hohe Rate an dihydrierten Metaboliten bilden.

Die Untersuchungen wurden an 1oo Patienten, die alle das gleiche Digoxinpräparat einnahmen, durchgeführt. Bei diesem unselektionierten Krankengut fanden wir einen radioimmunologisch gemessenen Serumspiegel von 1,5 $\pm$ 0,8 ng/ml. Bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz betrug der mittlere Digoxinspiegel bei einer konstanten peroralen Digoxindosis von 0,25 mg/die 1,1 $\pm$ 0,7 ng/ml. Bei Patienten mit einer elektrokardiographisch und klinisch gesicherten Digoxinintoxikation war der mittlere Digoxinspiegel mit 3,7 $\pm$ 1,1 ng/ml signifikant erhöht. Neben der Digoxindosis fand sich als weitere Ursache für die Digoxinintoxikation eine Nierenfunktionsstörung. Damit wird die schon lange bekannte Tatsache unterstrichen, daß die renale Elimination für die Kumulation von Digoxin eine bedeutende Größe darstellt (Doherty et al. 1964, Bloom und Nelp 1966, Marcus et al. 1966, 1966 a, Larbig et al. 1972, Jelliffe et al. 1972, Dettli et al. 1972, Grosse-Brockhoff et al. 1973). Bei einer Verminderung der Dosis auf 0,125 mg/die lagen die Serumspiegel in einem ähnlichen Bereich wie bei normaler Nierenfunktion.

Bei den 1oo Patienten betrug der mittlere Anteil der dihydrierten Metaboliten des Digoxins in der dichlormethanlöslichen Phase des Urins 12,4 ± 11%, wobei die Einzelwerte zwischen 2,2 und 52% lagen. Bei 85% der Patienten waren dihydrierte Metaboliten des Digoxins nachweisbar. Zwischen dem Anteil der dihydrierten Metaboliten und dem Serumdigoxinspiegel ließ sich keine signifikante Beziehung nachweisen.
Dieses bedeutet, daß die Bildung dieser Metabolitengruppe nicht an einen erhöhten Körperpool gebunden ist, wie Benthe (1977) für die Bildung von polaren Metaboliten annimmt. 7% der Patienten schieden mehr als 35% an dihydrierten Metaboliten im Urin aus und 53% mehr als 1o%. Die Häufigkeitsverteilung zeigt ein Maximum zwischen 1o und 15%. Für eine biomodale Verteilung, wie sie z.B. für das Isoniazid gefunden wurde (Evans et al. 1966), hatten wir keinen Anhalt.

Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz fanden wir einen ebenso hohen Anteil an dihydrierten Metaboliten wie bei anderen Patientengruppen. Auch bestand keine Präferenz für ein bestimmtes Geschlecht oder die Applikationsform. Die Höhe des Anteils der dihydrierten Metaboliten ist jedoch von der Therapiedauer abhängig. Bei einer Behandlungsdauer bis zu 1o Tagen wurden nur 6,4% und bei einer längeren Behandlungsdauer als 3o Tage 13,6% dihydrierte Metaboliten im Urin ausgeschieden.
Dieses könnte auf einer verzögerten Elimination der dihydrierten Metaboliten beruhen. Untersuchungen zur Kinetik von dihydrierten Metaboliten des Digoxins wurden beim Menschen jedoch bisher nicht durchgeführt. Für das Dihydrodigitoxin fand Repke (1961) bei der Ratte gegenüber dem Digitoxin keine Unterschiede in der Elimination.

Das Ausmaß der Metabolisierung zu dihydrierten Metaboliten des Digoxins konnte bei einigen Patienten über ein Jahr verfolgt werden und war in diesem Zeitraum relativ konstant. Über den Ort der Entstehung im Organismus gibt es bisher keine sicheren Angaben. Herrmann und Repke (1969) nehmen an, daß sie im Stuhl durch Bakterien gebildet werden. Bei einigen Patienten, die wegen einer Endokarditis mit hohen Dosen Penicillin behandelt wurden und bei denen eine gestörte Darmflora anzunehmen ist, konnten keine erniedrigten Anteile an dihydrierten Metaboliten des Digoxins gefunden werden. Dieses läßt die Annahme zu, daß diesem Mechanismus nur geringe Bedeutung bei der Entstehung zukommt.

Digoxin, aber auch Methyldigoxin, werden vor allem in der Leber metabolisiert (Doherty et al. 1961, Rietbrock und Abshagen 1973). Nach Untersuchungen von Abel et al. (1965) kann Digoxin auch extrahepatisch metabolisiert werden, wobei auch Darmwandenzymen Bedeutung zukommen könnte. Der metabolische Abbau von Digoxin geht über eine enzymatische Abspaltung von Digitoxosen bis zum Genin. Das Genin wird bei der Ratte sehr leicht, weniger beim Menschen, in 3-epi-Digoxigenin umgewandelt und kann ebenso wie die glykosidischen Metaboliten mit Glukuronsäure und Schwefelsäure konjugiert werden (Rietbrock et al. 1977). Weitere Abbauwege sind die Laktonringspaltung zu der Digoxigeninsäure (Benthe 1977), einem sehr polaren Metaboliten, und die Dihydrierung des Laktonringes.

Die Dihydrierung führt nur zu einer unwesentlichen Beeinflussung der Polarität. Sie ist nach unseren Ergebnissen unabhängig von der enzymatischen Hydrolyse, da alle hydrolytischen Metaboliten auch in reduzierter Form vorkommen. Der Hauptmetabolit ist jedoch in den meisten Fällen

das Dihydrodigoxin. Die wasserlöslichen oder polaren Metaboliten machen etwa 1o% des im Urin ausgeschiedenen Digoxins und seiner Metaboliten aus (Doherty et al. 1961, Marcus et al. 1964, Beermann et al. 1972, Clark und Kalman 1974). Über dihydrierte wasserlösliche Metaboliten des Digoxins ist nichts bekannt.

Die klinische Bedeutung der Metabolisierung des Digoxins zu dihydrierten Metaboliten wird an einem Einzelfall mit einer um das 5fache erhöhten Erhaltungsdosis besonders sichtbar. Es handelte sich um eine Patientin, die zur Reduktion der Kammerfrequenz bei Tachyarrhytmia absoluta und Vorhofflimmern bzw. -flattern mit einer peroralen täglichen Digoxindosis von 1,25 mg/die über viele Monate behandelt wurde. Bei ihr lagen 52% der in der Dichlormethanphase des Urins ausgeschiedenen Metaboliten in reduzierter Form vor. Im Blut waren anteilmäßig 4o% dihydrierte Metaboliten nachweisbar. Die Patientin bot keinerlei Intoxikationssymptomatik, welches auf den hohen Anteil an kardioinaktiven Metaboliten zurückzuführen ist.

Die Angaben von Clark und Kalman (1974), daß dihydrierte Metaboliten des Digoxins im Blut nur bei 3 von 15o Patienten in signifikanten Konzentrationen nachzuweisen waren, bedarf sicherlich einer ergänzenden Studie, da es sich um eine retrospektive Auswertung handelte und der verwandte Assay an der Nachweisbarkeitsgrenze für Digoxin lag. Unter geeigneten Bedingungen wird sich wahrscheinlich die Gruppe der dihydrierten Metaboliten auch im Blut in ähnlichen Konzentrationen wie im Urin nachweisen lassen.

Nach unseren Untersuchungen liegen die Konzentrationen der dihydrierten Metaboliten des Digoxins im Steady-state deutlich höher als nach Einmaldosen. Die klinische Relevanz dieser Metabolitengruppe ist daher unter einer Dauertherapie am größten. Bei hohem Digoxinbedarf sollte immer an die Möglichkeit einer verstärkten Metabolisierung zu dihydrierten bzw. kardioinaktiven Metaboliten gedacht werden.

7. Therapie mit Digitalisglykosiden

Welche therapeutischen Konsequenzen ergeben sich aufgrund unserer Daten für die klinische Anwendung? Gibt es eine Differentialtherapie für die einzelnen Herzglykoside Digitoxin oder Digoxin?

Einheitlich ergaben alle diesbezüglichen Studien, daß sich Digitoxin und Digoxin nicht in ihrer qualitativen Wirkung am Herzen unterscheiden, wohl aber ist ihre Pharmakokinetik unterschiedlich (Gillmann und Grosse-Brockhoff 1963, Moe und Farah 1975, Belz und Erbel 1977).

Es soll versucht werden, die Frage zu diskutieren, ob es eine Differentialtherapie aufgrund pharmakokinetischer Daten gibt.
Gegen das Digitoxin wurde in den letzten Jahren vorgebracht, daß die verstärkte Kumulation des Digitoxins gegenüber dem Digoxin eine höhere Gefährdung in Bezug auf die Intoxikation für den Patienten mit sich bringe (Doherty 1973, Kramer 1975). Zahlreiche Veröffentlichungen zur Häufigkeit der Digitalisintoxikation ergaben aber, daß dies nicht zutrifft. Während die Häufigkeit der Digoxinintoxikation je nach Studie zwischen 15 - 23% liegt (Fogelman et al.

1971, Beller et al. 1971, Ogilvie und Ruedy 1972, Howard et al. 1973, Smith 1975, Lichey et al. 1977), wurde für das Digitoxin in einer prospektiven Studie der Osloer Arbeitsgruppe um O. Storstein (1977) lediglich eine Intoxikationsquote von 5,8% ermittelt. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß die Kumulation (ε) der Digitalisglykoside allein von zwei Größen abhängt: der Eliminationshalbwertzeit ($t_{1/2}$ in h) und dem Dosierungsintervall (τ in h).

$$\varepsilon = \frac{\tau}{t_{1/2}}$$ (Kurz et al. 1977)

Das Dosierungsintervall ist demnach ein wichtiger Faktor für den Grad der Kumulation. Es wird daher weitgehend von den Dosierungsempfehlungen des Therapeuten abhängen, inwieweit ein Digitalisglykosid kumuliert.

Ein weiteres Hauptargument, das gegen das Digitoxin vorgebracht wird, bezieht sich auf die Dauer der Intoxikationssymptomatik nach Absetzen des Medikaments. Hierzu fanden Church et al. (1962) in interessanten, ethisch aber angreifbaren Untersuchungen an stationären Herzkranken mit freiwillig herbeigeführter Digitalisintoxikation, daß die zentralnervösen und auch die kardialen Intoxikationszeichen nach Absetzen von Digoxin und Digitoxin erstaunlicherweise ähnlich lange anhielten und nicht qualitativ unterschiedlich waren.

Weiter wird gegen das Digitoxin angeführt, daß die Auswirkungen einer Änderung der Eiweißbindung von einer stark eiweißgebundenen Substanz wie dem Digitoxin nicht in jedem Falle vorherzusagen ist. Nach unseren Untersuchungen führt aber die geringfügige Verminderung der Eiweißbindung von Digitoxin bei der chronischen Niereninsuffizienz nicht

zu einer toxischen Kumulation. Klinische Beobachtungen und pharmakokinetische Befunde stimmen hierin überein. Der Vorteil des Digitoxins gegenüber dem Digoxin bei der chronischen Niereninsuffizienz besteht darin, daß Digitoxin kompensatorisch verstärkt extrarenal eliminiert werden kann (Vöhringer 1978). Trotz verminderter renaler Exkretion von Digitoxin bei der chronischen Niereninsuffizienz braucht die Erhaltungsdosis von Digitoxin nicht reduziert werden, wie es noch von Jelliffe et al. (1972) und Dettli (1976) gefordert wurde.
Beim Digoxin wirkt sich die eingeschränkte Nierenfunktion besonders stark auf die Eliminationshalbwertzeit und die Serumspiegel aus.

Von besonderer klinischer Wichtigkeit ist dies bei den Fällen mit gering eingeschränkter Nierenfunktion, die in einer eingeschränkten Kreatininclearance, aber noch nicht in einer Kreatininerhöhung im Serum zum Ausdruck kommt (Grosse-Brockhoff et al. 1973). In diese Gruppe fallen vornehmlich alte Patienten. Diese Erkenntnis muß bei den Dosierungsempfehlungen für Digoxin und seine Derivate berücksichtigt werden.

Die Steuerbarkeit von Digitalispräparaten bezieht sich auf Änderungen von Serumspiegeln nach Dosisgabe oder Absetzen des Medikaments; d.h. Absorptionsrate und Eliminationskonstante bestimmen im wesentlichen die Steuerbarkeit. Der Vorteil von leicht steuerbaren Präparaten, wie Digoxin und Strophanthin (intravenöse Applikation) liegt auf der Hand. Schwierig wird die Situation für den Kliniker, wenn bestimmte Störgrößen wie z.B. Alter, Untergewicht mit entsprechend vermindertem Verteilungsraum und Nierenfunktionsstörungen auftreten. Die gute Steuerbarkeit des Digoxins hat sich in der Klinik wie die Intoxikationsstudien zeigen, nicht zum Vorteil gegenüber dem Digitoxin herausgestellt.

Hinsichtlich der Vollständigkeit und Gleichmäßigkeit der Resorption bestehen beim Digitoxin Vorteile. Ähnlich große Unterschiede in der biologischen Verfügbarkeit, wie sie von Lindenbaum et al. (1971) für 4 Digoxinpräparate berichtet wurden, sind bei Digitoxinpräparaten bisher nicht bekannt geworden. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß auch Digoxin durch eine Änderung der Galenik (Weichgelatineverkapselung von mikronisiertem Digoxin unter Beteiligung von Polyäthylenglykolen) fast vollständig resorbiert wird (Lindenbaum 1976). Daß eine Änderung der Galenik zu einem bedrohlichen Ansteigen von Intoxikationen führen kann, wenn eine entsprechende Aufklärung durch den Hersteller versäumt wird, wurde bereits eindrucksvoll belegt (Danon et al. 1977).

Bei der Leberzirrhose und der Hepatitis würden wir dem Digoxin gegenüber dem Digitoxin den Vorzug geben, da die Pharmakokinetik von Digoxin durch die Lebererkrankung nicht beeinflußt wird (Marcus und Kapadia 1964, Marcus 1973, Zilly et al. 1975, 1978).

Die folgenden Ausführungen befassen sich mit den Vollwirkdosen bzw. Sättigungsdosen und Erhaltungsdosen von Digitoxin und Digoxin bei chronischer Niereninsuffizienz und Leberzirrhose.
Die Vollwirkdosen für beide Herzglykoside betragen 0,8 - 1,5 mg (Peters et al. 1974, Grosse-Brockhoff et al. 1977). Sie wurden dem Körperbestand (body pool) unter Steady-state Bedingungen angeglichen. Für das Digoxin sollte bei der chronischen Niereninsuffizienz wegen des verkleinerten Verteilungsraumes die Vollwirkdosis 0,6 - 1,0 mg nicht übersteigen (Wagner 1975). Die früher verwandten hohen Vollwirkdosen von 2 mg waren an dem klinischen Modell der Tachyarrhythmia absoluta ermittelt. Bei einigen Patienten mit der schnellen Form der absoluten Arrhythmie bei Vorhof-

flimmern scheinen subtoxische Dosen notwendig zu sein, um durch eine partielle Blockierung der av-Überleitung eine ausreichende Reduktion der Kammerfrequenz zu erzielen (Goldman et al. 1975, Grosse-Brockhoff et al. 1977). Dies könnte seine Ursache in einer geringeren Glykosidempfindlichkeit der Membran-ATPase des Reizleitungssystems gegenüber dem Arbeitsmyokard haben (Kübler et al. 197o). Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz und Sinusrhythmus sind zur Steigerung der Herzkraft aber geringere Vollwirkdosen ausreichend.

Beim Digitoxin empfiehlt sich immer eine mittelschnelle Aufsättigung, da bei einer langsamen Aufsättigung mit einer Erhaltungsdosis erst nach 3o - 4o Tagen ein Steadystate Serumspiegel erreicht wird. Wir empfehlen bei Patienten mit Herzinsuffizienz, Herzinsuffizienz und zusätzlicher chronischer Niereninsuffizienz und auch dem nephrotischen Syndrom mit chronischer Niereninsuffizienz eine Erhaltungsdosis von O,1 mg Digitoxin/die. Hiermit lassen sich mehr als 9o% der Patienten ohne Gefahr einer Unter- oder Überdosierung behandeln. Bei der Leberzirrhose wird in Einzelfällen eine Dosisreduktion notwendig sein.

Beim Digoxin ist versucht worden, eine Anpassung der Erhaltungsdosis an die Nierenfunktion vorzunehmen (Jelliffe et al. 1972, Dettli et al. 1972, Risler et al. 1974, Dettli 1976).

Die Ergebnisse von Peck et al. (1973) und Wagner et al. (1974) zeigten jedoch, daß trotz Berücksichtigung von Nomogrammen sich nur 17,6% der Variabilität der individuellen Serumdigoxinspiegel erklären läßt. Aus diesen Gründen und Erwägungen bei der Handhabung neigen wir eher dazu, die Erhaltungsdosis von Digoxin bei einer um 5o% verminderten Kreatininclearance auf die Hälfte festzulegen und bei terminaler Nierenin-

suffizienz auf ein Drittel der normalen Erhaltungsdosis zu reduzieren. Bei normaler Nierenfunktion sollte die perorale Erhaltungsdosis 0,25 - 0,375 mg Digoxin/die bzw. entsprechende äquivalente Dosen für die Digoxinderivate ß-Acetyl- und ß-Methyldigoxin nicht überschreiten. Bei der Leberzirrhose braucht für Digoxin weder die Vollwirkdosis noch die Erhaltungsdosis geändert zu werden.

Es wurde versucht, mittlere Leitlinien für die Dosierung von Digitoxin und Digoxin zu erarbeiten. Trotzdem behält der alte Grundsatz von Withering (1785), daß die Dosis bei jedem einzelnen Patienten an der Wirkung und auch an den Nebenwirkungen festzulegen ist, seine Bedeutung (Koch-Weser 1975, Hausamen und Peters 1976).
In der Klinik sind Fälle bekannt, bei denen trotz eindeutiger Intoxikationszeichen niedrige Serumdigitalisspiegel gemessen werden. Andererseits gibt es Fälle, bei denen bei erhöhten Digitalisspiegeln keine Hinweise für eine Digitalisintoxikation bestehen. Individuelle Digitalistoleranz und Empfindlichkeit des Myokards sind neben zahlreichen extrakardialen Faktoren dafür die Ursachen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß in den meisten Fällen die Bestimmung von Digitalisserumspiegeln, die an verschiedenen Tagen durchgeführt werden sollte, mehr zur Verdachtsdiagnose einer Digitalisintoxikation beitragen kann als die Patienten- und Medikamentenanamnese. Erschwerend kommt hinzu, daß es leider auch keine typischen EKG-Veränderungen für eine Digitalisintoxikation zu geben scheint (Ogilvie und Ruedy 1972, Risler et al. 1975). Wenn ausgeprägte Intoxikationszeichen, wie z.B. Farbensehen fehlen, könnte eine Digitalisintoxikation ohne Serumspiegelbestimmungen nur durch den Auslaßversuch von Digitalis erkannt werden (Hausamen und Peters 1976).

Die Bestimmung des Serumdigitalisspiegels ist in solchen Fällen von besonderem Wert, da sie ein gezieltes Handeln ermöglicht. Untersuchungen im Rahmen des Boston Collaborative Drug Surveillance Program von Koch-Weser et al. (1974) und Duhme et al. (1974) haben außerdem ergeben, daß sich durch eine regelmäßige Kontrolle des Serumdigoxinspiegels, die Zahl der Digoxinintoxikationen von 13,9% auf 5,9% senken ließ.

Jelliffe et al. (1972) erzielten eine ähnliche Senkung der Intoxikationsquote für Digoxin von 35% auf 12%, wobei mit einem Computerprogramm, unter Berücksichtigung von Präparat, Dosis, Körpergröße, Körpergewicht und Nierenfunktion, die Erhaltungsdosis berechnet wurde.

Andererseits wird man häufig mit dem Problem konfrontiert, daß Patienten bei der stationären Aufnahme trotz angeblich regelmäßiger Einnahme von einer normalerweise ausreichenden Erhaltungsdosis, manifeste Herzinsuffizienzzeichen zeigen. Zahlreiche Ursachen können dem zugrunde liegen: Übermäßige körperliche Belastung, dekompensierte Hypertonie, akuter rheumatischer Schub einer Endomyokarditis, Herzrhythmusstörungen und hochgradiger Herzklappenfehler.

In einigen Fällen ergibt die Bestimmung der Serumdigitalisspiegel von Digoxin oder Digitoxin außerordentlich niedrige Werte (z.B. $\lesssim$ 0,5 ng/ml bzw. $\lesssim$ 1o,o ng/ml). Als Ursache in bis zu 34% der Fälle fand sich eine unregelmäßige Einnahme von Digitalis (Weintraub et al. 1973, Carruthers et al. 1974). Weiter muß beim Digoxin an eine verminderte biologische Verfügbarkeit und eine enterale Arzneimittelinteraktion oder beim Digitoxin an eine metabolische Interaktion bzw. verminderte Eiweißbindung gedacht werden.
Im einzelnen sind als häufigste Ursachen für zu niedrige

Digitalisspiegel anzuführen:

1. Unregelmäßige, unterdosierte Digitaliseinnahme.
2. Verminderte biologische Verfügbarkeit.
3. Absorptionsstörungen (Bindung von Digitalis an Kohle, Ionenaustauscher, Adsorbentien, Malabsorptionssyndrom).
4. Verstärkter Metabolismus (genetisch oder durch sogenannte Enzyminduktoren bedingt).
5. Vergrößerung des Verteilungsraumes.
6. Verdrängung aus der Eiweißbindung durch andere Medikamente.

Eine Digitalisintoxikation läßt sich entweder auf eine zu hohe Vollwirkdosis oder eine individuell überhöhte Erhaltungsdosis zurückführen. Dies gilt für Digoxin und seine Derivate und auch für das Digitoxin.
Beim Digitoxin kann in seltenen Einzelfällen (z.B. bei der Leberzirrhose) aber auch eine Änderung des Verhältnisses von freiem und eiweißgebundenem Digitalis im Serum, wie sie bei Eiweißmangel oder Interaktion mit stark eiweißgebundenen Substanzen vorkommt, zur Intoxikation führen, wenn nicht Kompensationsmechanismen eine toxische Kumulation des eiweißungebundenen Anteils verhindern (Lukas und Peterson 1966, Solomon und Abrams 1972, Gugler et al. 1975, Peters et al. 1977 a, 1978). Obwohl der Serumdigitoxinspiegel noch im sog. therapeutischen Bereich liegt, kann die eiweißungebundene Digitalisfraktion toxisch erhöht sein.

Zur Charakterisierung von Serumdigitalisspiegeln wurden die Begriffe therapeutischer und toxischer Bereich in der Literatur eingeführt. Wenn man diesen Bereichen Serumdigitalisspiegel zuordnet, so ist davon auszugehen, daß sich sowohl toxischer und therapeutischer als auch therapeutischer und subtherapeutischer Bereich überlappen

(Smith und Haber 197o, Beller et al. 1971, Fogelman et al. 1971, Howard et al. 1973, Peters et al. 1974, Joubert et al. 1975, Ingelfinger und Goldman 1976, Lichey et al. 1977, Smith et al. 1977).
Zahlreiche Studien haben ergeben, daß die Serumspiegel bei Digitalisintoxikation signifikant höher lagen als bei Patienten, die keine Intoxikationssymptome zeigten (Lukas und Peterson 1966, Smith et al. 1969, Beller et al. 1971, Bertler und Redfors 1971, Rasmussen et al. 1971, Morrison und Killip 1972, Carruthers et al. 1974, Peters et al. 1974).

Nach unseren Erfahrungen und denen zahlreicher anderer Autoren dürfte der toxische Bereich für Digitoxin bei einer Serumkonzentration von 35 - 4o ng/ml beginnen (Lukas und Peterson 1966, Smith 197o, Bentley et al. 197o, Morrison und Killip 1972, Peters et al. 1974), während er beim Digoxin bei höheren Werten als 2,5 ng/ml angenommen wird (Smith und Haber 197o, Carruthers et al. 1974, Lichey et al. 1977). Der sogenannte therapeutische Bereich reicht für das Digitoxin von 1o bis 35 ng/ml und für das Digoxin von O,6 bis 2,o ng/ml, während der subtherapeutische Bereich entsprechend niedriger liegt (Shapiro et al. 1972, Doherty 1973, Chavaz et al. 1974, Carruthers et al. 1974, Lichey et al. 1977).

Ziel der Therapie wird es sein, den engen therapeutischen Bereich der Herzglykoside für die Wirkung zu nutzen und Nebenwirkungen zu vermeiden (Schmiedeberg 1883). Bei der Überwachung gibt die Bestimmung des Serumdigitalisspiegels eine wichtige zusätzliche Information und hat die Dosierung sicherer gemacht (Chamberlain et al. 1971, Doherty 1976, Lasagna 1976, Huffman et al. 1976).
Es bleibt jedoch Aufgabe eines jeden Arztes, den Patienten über die Notwendigkeit der Digitalisbehandlung und über die Wirkung, Nebenwirkung und tägliche Dosis des jeweiligen

Digitalisglykosids zu informieren. Allein hiermit konnten Ogilvie und Ruedy (1972) eine Senkung der Nebenwirkungsrate beim Digoxin von 21,4% auf 12,3% erreichen. Zusätzlich ließe sich der Patient durch eine solche Aufklärung wahrscheinlich am ehesten veranlassen, seine Digitalismedikation regelmäßig einzunehmen.

8. Zusammenfassung

1. Es wurde ein spezifischer Radioimmunoassay für Digitoxin beschrieben, der analog dem Verfahren von Smith, Butler und Haber (197o) unter Verwendung von Kaninchenantiserum in eigenen Untersuchungen entwickelt wurde. Er erlaubt, in verschiedenen Körperflüssigkeiten Digitoxin und seine immunreaktiven Metaboliten zu messen. Die untere Nachweisgrenze beträgt bei einem Probenvolumen von O,1 ml O,3 ng/ml im Serum. Verschiedene unspezifische Beeinflussungsmöglichkeiten des Assays wie z.B. Albumin-, Proteinkonzentration und Bilirubingehalt der Serumprobe wurden überprüft.
Steroidmoleküle wie Cholesterin, Aldosteron, Östradiol, Cortisol und Canrenoat-Kalium ergaben in-vitro in mehr als 1o ooofach molarem Überschuß keine signifikante Kreuzreaktion. In-vivo bestand für Canrenoat-Kalium und Spironolacton keine Kreuzreaktion. Testosteron und Progesteron zeigten lediglich in mehr als 1ooofach molarem Überschuß eine signifikante Kreuzreaktion. Die Kreuzreaktivität gegenüber Dihydrodigitoxin betrug 2,7%.

Die Äquilibriumskonstante des Antikörpers wurde mit der Sättigungsmethode bestimmt. Sie betrug $1{,}43 \times 1o^{1o}\ M^{-1}$ und die Bindungskapazität des Antiserums 1o53,o nmol/ml für ^{3}H-Digitoxin. Die Richtigkeit für die Serumstandards mit den Konzentrationen 5,o, 1o,o und 2o,o ng/ml betrug $4{,}9 \pm O{,}26$ ng/ml, $9{,}9 \pm O{,}66$ und $19{,}7 \pm 1{,}o3$ ng/ml. Die Präzision lag für 2o Einzelmessungen innerhalb einer Serie für die oben angegebenen Konzentrationen bei 3,6%, 5,8% und 3,7% (VK) und für die verschiedenen Kontrollseren von Serie zu Serie an 25 verschiedenen Tagen bei 5,3%, 6,6% und 5,2% (VK).

2. Bei herzinsuffizienten Patienten betrug der mittlere Serumdigitoxinspiegel bei einer peroralen Erhaltungsdosis von O,1 mg Digitoxin/die $26{,}5 \pm 7{,}3$ ng/ml und bei

einer Erhaltungsdosis von 0,143 mg/die (entsprechend 1,0 mg Digitoxin/Woche) 33,5 ± 5,5 ng/ml. Die Streuungen der Einzelwerte betrugen 27,5% und 16,4%. Die Konzentration des freien Digitoxins wurde mit 0,8 ± 0,3 ng/ml gemessen (VK = 37,5%). Die Eiweißbindung für Digitoxin betrug 96, 2 ± 1,3%. Die Digitoxinkonzentration im Speichel machte 12,1 - 31,9% der Digitoxinkonzentration im Serum aus. Zwischen der Digitoxinkonzentration im Speichel und der Serumdigitoxinkonzentration bzw. der eiweißungebundenen Digitoxinkonzentration im Serum bestanden keine signifikanten Korrelationen. Bei gesunden Probanden betrug die Serumhalbwertzeit für Digitoxin 7,6 ± 1,6 Tage (k_e = 0,0956 ± 0,0316 $Tage^{-1}$). Der fiktive Verteilungsraum wurde unter Steady-state Bedingungen im Mittel mit 40,7 l bzw. 0,59 l pro/kg und im Pseudoäquilibrium mit 32,3 ± 3,1 l bzw. 0,48 kg/l gemessen. Im 24-h-Urin wurden unter Steady-state Bedingungen im Mittel 26,4 ± 11,0% der täglichen Dosis als Digitoxin und immunreaktive Metaboliten ausgeschieden. Nach ^{3}H-Digitoxin-Injektion wurden am ersten Tag 4,4% der Dosis und bis zum 7. Tag 21,2% renal eliminiert. Die totale Körperclearance errechnete sich mit 2,6 ml/min , davon entfiel im Mittel 1,1 ml/min auf die renale Clearance.

3. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz betrugen bei einer peroralen Dosis von 0,1 mg Digitoxin/die und 0,143 mg Digitoxin/die (entsprechend 1,0 mg Digitoxin/Woche) die mittleren Serumdigitoxinspiegel 23,2 ± 7,8 ng/ml (VK = 33,6%) und 29,9 ± 6,6 ng/ml (VK = 22,1%). Beim nephrotischen Syndrom mit chronischer Niereninsuffizienz lag der Serumdigitoxinspiegel bei 11,2 ± 5,2 ng/ml (VK = 46,4%). Die Eiweißbindung von Digitoxin war bei chronischer Niereninsuffizienz geringgradig auf 95,3 ± 1,8% erniedrigt. Die eiweißungebundene Digitoxinkonzentration

war gegenüber herzinsuffizienten Patienten nicht erhöht und betrug 0,9 ± 0,4 ng/ml. Die Absorption von Digitoxin wurde durch die chronische Niereninsuffizienz nicht beeinflußt. Das Aluminiumhydroxid verminderte die biologische Verfügbarkeit von Digitoxin nicht. Die Serumhalbwertzeit von Digitoxin war signifikant auf 5,7 ± 0,9 Tage verkürzt (k_e = 0,1246 ± 0,0170 $Tage^{-1}$). Das fiktive Verteilungsvolumen betrug im Äquilibrium 34,4 l bzw. 0,51 l/kg. Es lag gegenüber der nierengesunden Kontrollgruppe gering niedriger, unterschied sich aber nicht signifikant. Die renale Exkretion von Digitoxin und seinen immunreaktiven Metaboliten im Steady-state war mit 12,1 ± 6,1% der täglichen Dosis gegenüber der Kontrollgruppe mit normaler Nierenfunktion signifikant erniedrigt. Die renale Clearance war um über 50% vermindert, während die totale Körperclearance von Digitoxin gegenüber Herzinsuffizienten leichtgradig auf 2,9 ml/min und die sogenannte metabolische Clearance von Digitoxin deutlich auf 2,5 ml/min erhöht waren. Die Studien zum Metabolismus von ^{3}H-Digitoxin erbrachten am ersten Tag eine wasserlösliche Metabolitenfraktion im Urin von 19,6 ± 7,0%. Sie erhöhte sich signifikant mit längerer Verweilzeit auf 36,9 ± 8,9% am siebten Tag. Gegenüber herzinsuffizienten Patienten, die im Mittel am ersten Tag 29,6 ± 12,6% und am siebten Tag 27,0 ± 12,8% wasserlösliche Metaboliten des Digitoxins im Urin ausschieden, waren die Unterschiede nicht signifikant. In der dichlormethanlöslichen Metabolitenphase des Urins ließ sich bei Patienten mit alleiniger Herzinsuffizienz und Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz lediglich Digitoxin dünnschichtchromatographisch identifizieren.

Die Ansprechbarkeit des Myokards auf eine einmalige intravenöse Wirkdosis von 0,75 mg Digitoxin war bei einzelnen

Patienten mit dekompensierter Niereninsuffizienz im präurämischen Stadium deutlich vermindert.

4. Bei Patienten mit Leberzirrhose wurde unter einer peroralen Dosis von 0,1 mg Digitoxin/die ein mittlerer Serumdigitoxinspiegel von 18,4 $\pm$ 3,1 ng/ml (VK = 16,8%) gemessen. Die eiweißungebundene Digitoxinfraktion im Serum war auf 1,5 $\pm$ 0,7 ng/ml (VK = 46,7%) signifikant erhöht. Die Eiweißbindung von Digitoxin war auf 91,9% $\pm$ 4,1% und von ^{3}H-Digitoxin, das zur Serumprobe des Patienten zugesetzt wurde, auf 92,2 $\pm$ 5,2% signifikant erniedrigt. Die Serumhalbwertzeit von Digitoxin betrug 7,9 $\pm$ 2,o Tage. Die tägliche renale Exkretion von Digitoxin und seinen immunreaktiven Metaboliten war auf 42,2 $\pm$ 13,6% der Erhaltungsdosis gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die totale Körperclearance war im Mittel auf 3,7 ml/min erhöht, wobei renale und metabolische Clearance anteilmäßig auf 1,6 ml/min und 2,1 ml/min erhöht waren. Das fiktive Verteilungsvolumen im Pseudoäquilibrium war signifikant auf 65,3 $\pm$ 19,9 l bzw. 1,o4 l/kg erhöht, während es unter Steady-state Bedingungen im Mittel 59,8 l bzw. 0,94 l/kg betrug.

5. Die Serumdigoxinkonzentrationen betrugen bei Patienten mit Herzinsuffizienz unter einer täglichen peroralen Dosis von 0,25 mg Digoxin 1,1 $\pm$ 0,7 ng/ml (VK = 63,3%) und bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 2,2 $\pm$ 1,o ng/ml (VK = 45,5%). Toxische Serumdigoxinspiegel lagen im Mittel bei 3,7 $\pm$ 1,1 ng/ml (VK = 29,7%). Bei 1oo Patienten wurden Metabolitenstudien des Digoxins im Urin unter besonderer Berücksichtigung der Reduktion durchgeführt. Im Mittel wurden 12,4 $\pm$ 11,o% (2,2 - 52%) der lipidlöslichen Metabolitenphase des Digoxins als dihydrierte Metaboliten ausgeschieden. Bei 53% der Patienten

konnten mehr als 1o% und bei 7% der Patienten mehr als 35% dieser Metabolitengruppe im Urin nachgewiesen werden. Alter, Geschlecht, Digoxindosis, Digoxinkonzentration im Serum, Applikationsart, antibiotische Therapie und Nierenfunktionsstörung hatten keinen Einfluß auf die Bildungs- und Exkretionsrate der dihydrierten Metaboliten. Die Bildungsrate war aber von der Verweildauer im Körper abhängig.

Bei einer Patientin, die mit einer täglichen peroralen Dosis von 1,25 mg Digoxin über 14 Monate zur Reduktion der Kammerfrequenz bei Tachyarrythmia absoluta behandelt wurde, ließen sich 52% der lipidlöslichen Metaboliten als reduzierte Metaboliten im Urin nachweisen. Im Blut befanden sich 4o%. Der Hauptmetabolit war Dihydrodigoxin, aber auch Digoxigeninbisdigitoxosid und Digoxigeninmonodigitoxosid kamen als reduzierte Metaboliten vor. Die Patientin wies keine Zeichen einer Digitalisintoxikation auf. Die Reduktion des Laktonringes von Digoxin wird als bedeutendster metabolischer Schritt angesehen, da er zu kardioinaktiven Metaboliten führt.

6. Als Vollwirkdosis bzw. Sättigungsdosis für Digitoxin und Digoxin werden aufgrund vorliegender Befunde 0,8 - 1,5 mg empfohlen. Bei der chronischen Niereninsuffizienz ist für Digitoxin keine Erniedrigung der Vollwirkdosis notwendig, während für das Digoxin aufgrund des verkleinerten Verteilungsvolumens die Vollwirkdosis 0,6 - 1,o mg betragen sollte. Die mittlere Erhaltungsdosis für Digitoxin beträgt bei alleiniger Herzinsuffizienz und chronischer Niereninsuffizienz 0,1 mg/die. Für Digoxin empfehlen wir bei alleiniger Herzinsuffizienz 0,25 - 0,375 mg/die. Bei der Leberzirrhose kann in Einzelfällen eine Verminderung der Erhaltungsdosis

von Digitoxin notwendig sein. Für das Digoxin empfehlen wir bei einem um 5o% eingeschränkten Glomerulumfiltrat eine Dosisreduktion auf 5o% der normalen Erhaltungsdosis und bei terminaler Niereninsuffizienz auf 1/3 der Erhaltungsdosis. Bei der Leberzirrhose ist eine Dosisreduktion für Digoxin nicht notwendig.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Grosse-Brockhoff, emeritierter Direktor der 1. Medizinischen Universitätsklinik, möchte ich für die zahlreichen Anregungen und für die freundliche Förderung meiner Arbeit recht herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. T.-U. Hausamen danke ich für die Einführung in die experimentellen Untersuchungstechniken. Mit seinen Ratschlägen und Ideen hat er mir sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. W. Staib, Direktor des Institutes für Physiologische Chemie, Lehrstuhl II, bin ich für die Hilfe bei der Durchführung der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen sehr dankbar.

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. S.M. Kalman, Direktor des Pharmakologischen Institutes an der Medical School in Stanford, wurden die Untersuchungen zum Stoffwechsel und Metabolismus von Digoxin durchgeführt. Ich danke ihm ganz besonders für die Überlassung dieses Aufgabengebietes.

Fräulein Kroukou hat mir durch ihre korrekte und fleißige Mitarbeit bei der Ausführung der vorliegenden Untersuchungen sehr geholfen.

Durch die Sach- und Personalhilfe des Sonderforschungsbereichs Kardiologie, Düsseldorf, wurde diese Arbeit großzügig unterstützt, wofür ich zu Dank verpflichtet bin.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Abel, R.M., R.J. Luchi, G.W. Peskin, H.L. Conn, L.D. Miller:
Metabolism of digoxin: role of the liver in tritiated digoxin degradation.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 15o, 463 (1965)

Abshagen, U., H. Kewitz, N. Rietbrock:
Distribution of digoxin, digitoxin and ouabain between plasma and erythrocytes in various species.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 27o, 1o5 (1971)

Andreasen, F.:
The effect of dialysis on the protein binding of drugs in the plasma of patients with acute renal failure.
Acta Pharmacol. et. Toxicol. 34, 284 (1974)

Andreasen, P.B., G. Greisen:
Phenazone metabolism in patients with liver disease.
J. Clin. Invest. 6, 21 (1976)

Ariens, E.J.:
Drug levels in the target tissue and effect
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 155 (1974)

Aschenbrenner, R.:
Digitalis and Strophanthus- erste Anfänge der klinischen Pharmakologie in Deutschland.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 1 (1977)

Ashley, J.J., B.T. Brown, G.T. Okita, and S.E. Wright:
The metabolites of cardiac glycosides in human urine.
J. Biol. Chem. 232, 315 (1958)

Augsberger, A.:
Quantitives zur Therapie mit Herzglykosiden. I. Mitteilung: Die Variabilität von Glykosidbedarf und -toleranz.
Med. Welt 2o, 1471 (1951)

Augsberger, A.:
Quantitatives zur Therapie mit Herzglykosiden. II. Mitteilung: Kumulation und Abklingen der Wirkung.
Klin. Wochenschr. 32, 945 (1954)

Azarnoff, D.:
Application of blood level data to clinical trials.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 183 (1974)

Bach, E.J., M. Reiter:
The difference in velocity between the lethal and inotropic action of dihydrodigoxin.
Arch. Exp. Pathol. Pharmak. 248, 437 (1964)

Beermann, B., K. Hellström, and A. Rosen:
Fate of orally administered ^{3}H-digitoxin in man with special reference to the absorption.
Circulation 43, 852 (1971)

Beermann, B., K. Hellström, and A. Rosen:
The absorption of orally administered 12 α ^{3}H-digoxin in man.
Clin. Sci. 43, 5o7 (1972)

Beermann, B.:
The gastrointestinal uptake of methyldigoxin-12 α-^{3}H- in man.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 5, 28 (1972)

Beller, G.A., T.W. Smith, W.H. Abelman, E. Haber, W.B. Hood, Jr.:
Digitalis intoxication: a prospective clinical study with serum level correlations.
N. Engl. J. Med. 284, 989 (1971)

Belz, G.G., R. Erbel:
Relationship between doses, plasma levels and cardiac effects under digitalis treatment. In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 254. Bonn 1977, Springer Verlag

Bennhold, H.:
Die Vehikelfunktion der Bluteiweißkörper. In:Bennhold., H., E. Kylin, S. Rusznyak (Hrsg.), Die Eiweißkörper des Blutplasmas. Steinkopf Verlag, Leipzig 1938

Benthe, H.F.:
Occurence and chemical nature of polar water-soluble digoxin metabolites. In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 52. Bonn 1977, Springer Verlag

Bentley, J.D., G.H. Burnett, R.L. Conklin, and R.H. Wasserburger:
Clinical application of serum digitoxin levels. A simplified plasma determination.
Circulation 41, 67 (197o)

Berson, S.A., R.S. Yalow, A. Bauman, M.A. Rothschild, K. Newerly:
Insulin J^{131} metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest. 35, 17o (1956)

Bertler, A. and A. Redfors:
Plasma levels of digoxin in relation to toxicity.
Acta Pharmacologia 29, 281 (1971)

Binnion, P.F., L.M. Morgan, H.M. Stevenson, and E.Fletcher:
Plasma and myocardial digoxin concentrations in patients on oral therapy.
Br. Heart. J. 31, 636 (1969)

Blaschke, T.F.:
Protein binding and kinetics of drugs in liver diseases.
Clin. Pharmacokinet. 2, 32 (1977)

Bloom, P.M., W.B. Nelp:
Relationship of the excretion of tritiated digoxin to renal function.
Am. J. Med. Sci. 251, 133 (1966)

Blumberger, Kj.:
Die Anspannungszeit und Austreibungszeit beim Menschen.
Arch. Kreislaufforschg. 6, 2o3 (194o)

Bodem, G., K. Wirth, E. Gernand, H.J. Dengler:
Pharmacokinetics and metabolism of α -Acetyldigoxin in man.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 2o8, 1o2 (1974)

Bodem, G., K. Wirth, H.J. Dengler:
Untersuchungen zum Stoffwechsel und zur Pharmakokinetik von Acetyldigitoxin beim Menschen.
Arzneim. Forsch.(Drug. Res.) 25, 1448 (1975)

Bodem, G., E. v. Unruh:
Dihydrodigitoxin, a metabolite of digitoxin in humans.
In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 74. Bonn 1977, Springer Verlag

Breimer, D.D., W. Zilly, E. Richter:
Pharmacokinetics of hexobarbital in acute hepatitis and after recovery.
Clin. Pharmacol. Ther. 18, 433 (1975)

Brodie, B.B., W.D. Reid:
The value of determining the plasma concentration of drugs in animals and man. In: La Du, B.N., H.G. Mandel, E.L. Way (eds.), Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. Williams & Wilkins, Baltimore 1971

Burnett, G.H., R.L. Conklin:
The enzymatic of plasma digitoxin levels.
J. Lab. Clin. Med. 71, 1o4o (1968)

Butler, V.P., J.P. Chen:
Digoxin-specific antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 57, 71 (1967)

Butler, V.:
Assays of digitalis in the blood.
Progr. Cardiovasc. Dis. 14, 571 (1972)

Caldwell, J.H., N.J. Greenberger:
Interruption of the enterohepatic circulation of digitoxin by cholestyramine. I. Protection against lethal digitoxin intoxication.
J. Clin. Invest. 5o, 2o26 (1971)

Caldwell, J.H., C.A. Bush, N.J. Greenberger:
Interruption of the enterohepatic circulation of digitoxin by cholestyramine. II. Effect on metabolic disposition of tritium-labeled digitoxin and cardiac systolic intervals in man.
J. Clin. Invest. 5o, 2638 (1971)

Campbell, R.C.:
Statistische Methoden für Biologie und Medizin. (Übersetzt von P. Ihm). Thieme Verlag 1971

Campion, D.S.:
Decreased drug binding by serum albumin during renal failure.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 391 (1973)

Carruthers, S.G., J.G. Kelly, D.G. McDevitt:
Plasma digoxin concentrations in patients on admission to hospital.
Br. Heart J. 36, 7o7 (1974)

Carvalhas, M.L., M.A. Figueira:
Comparative study of thin-layer chromatographic techniques for separation of digoxin, digitoxin and their main metabolites.
J. Chromatogr. 86, 254 (1973)

Cerceo, E., C.A. Elloso:
Factors affecting the radioimmunoassay of digoxin.
Clin. Chem. 18, 539 (1972)

Chamberlain, D., A. Redfors, A. Bertler, J. Coltart, R. White:
The value of plasma- digoxin assay.
Lancet 943/1971

Chang, J.J., C.P. Crowl, R.S. Schneider:
Homogeneous enzyme immunoassay for digoxin.
Clin. Chem. 21, 967 (1975)

Chavaz, A., L. Balant, J. Fabre:
Digoxinémie et digitalisation.
Schweiz. Med. Wochenschr. 1o4, 65 (1974)

Chen, K.K., F.G. Henderson:
Pharmacology of sixty-four cardiac glykosides and aglycones.
J. Pharmacol. 111, 365 (1954)

Church, G., L. Schamroth, N.L. Schwartz, H.J.L. Marriot:
Deliberate digitalis intoxication.
Ann. Intern. Med. 57, 946 (1962)

Clark, D.R., S.M. Kalman:
Dihydrodigoxin: A common metabolite of digoxin in man.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 2, 148 (1974)

Coltart, J., M. Howard, D. Chamberlain:
Myocardial and skeletal muscle concentrations of digoxin
in patients on long-term therapy.
Br. Med. J. 2, 318 (1972)

Damm, K.H., A. Grosshauser, R.R. Erttmann:
Intestinal transport of ^{3}H-digitoxin in vitro incompatible
with simple diffusion.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 289, 217 (1975)

Danon, A., J. Horowitz, Z. Ben-Zvi, J. Kaplanski, S. Glick:
An outbreak of digoxin intoxication.
Clin. Pharmacol. Ther. 21, 643 (1977)

Dengler, H.J., G. Bodem, H.J. Gilfrich:
Digotxin pharmacokinetics and their relation to the
clinical dosage parameters. In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.),
International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 211.
Bonn 1977, Springer Verlag

Dettli, L., E.E. Ohnhaus, P. Spring:
Digoxin dosage in patients with impaired kidney function.
Br. J. Clin. Pharmacoly 44, 373 (1972)

Dettli, L.:
Arzneimitteldosierung bei Niereninsuffizienz. In: Kümmerle, H.P., E.R. Garrett, K.H. Spitzy (eds.), Urban und Schwarzenberg Verlag, 1976

Doherty, J.E., W.H. Perkins, G.K. Mitchell:
Tritiated digoxin studies in human subjects.
Arch. Intern. Med. 1o8, 531 (1961)

Doherty, J.E., W.H. Perkins, M.C. Wilson:
Studies with tritiated digoxin in renal failure.
Am. J. Med. 37, 536 (1964)

Doherty, J.E.:
The clinical pharmacology of digitalis glycosides: a review.
Am. J. Med. Sci. 255, 382 (1968)

Doherty, J.E., W.H. Hall, M.L. Murphy, O.W. Beard:
New information regarding digitalis metabolism.
Chest 59, 433 (1971)

Doherty, J.E.:
Of toads and flowers.
Circulation 47, 212 (1973)

Doherty, J.E.:
Digitalis Glycosides.
Pharmacokinetics and their clinical implications.
Ann. Int. Med. 79, 229 (1973 a)

Doherty, J.E.:
Digitalis blood levels and toxicity.
N. Engl. J. Med. 295, 227 (1976)

Dromgoole, S.H.:
The binding capacity of albumin and renal disease.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 191, 318 (1974)

Duhme, D.W., D.J. Greenblatt, J. Koch-Weser:
Reduction of digoxin toxicity associated with measurement of serum levels. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program.
Ann. Intern. Med. 8o, 516 (1974)

Dutta, S., B.H. Marks:
Factors that regulate ouabain-^{3}H accumulation by the isolated guinea-pig heart.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 17o, 318 (1969)

Dvorchik, B.H., E.S. Vesell:
Pharmacokinetic interpretation of data gathered during therapeutic drug monitoring.
Clin. Chem. 22/6, 868 (1976)

Edens, E.:
Über Digitaliskumulation und langdauernde Strophanthinbehandlung.
Klin. Wochenschr. 15, 1829 (1936)

Eidus, L., G.M. Ling, A.M.T. Harnanansingh:
Laboratory investigation of rifampin.
Int. J. Clin. Pharmacol. 24, 296 (1969)

Erdmann, E., P. Presek, R. Swozil:
Über den Einfluß von Kalium auf die Bindung von Strophanthin an menschliche Herzmuskelzellmembranen.
Klin. Wochenschr. 54, 383 (1976)

Evans, D.A.P., K.A. Manley, V.C. McKusick:
Genetic control of isoniazid metabolism in man.
Br. Med. J. 2, 485 (1960)

Fawaz, G., A. Farah:
A study of the digitoxin binding power of serum and other soluble tissue-proteins of the rabbit.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 80, 193 (1944)

Finkelstein, F.O., J.A. Goffinet, E.D. Hendler, J. Lindenbaum:
Pharmacokinetics of digoxin and digitoxin in patients undergoing hemodialysis.
Am. J. Med. 58, 525 (1975)

Flasch, H., N. Heinz, R. Petersen:
Affinität von polaren Digoxin- und Digitoxin-Metaboliten zu Digoxin- und Digitoxin-Antikörpern.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27(I), 3 (1977)

Fogelman, A,M., J.T. La Mont, S. Finkelstein, E. Rado:
Fallibility of plasma-digoxin in differentiating toxic from non-toxic patients.
Lancet 2/1971, 727

Forth, W., E. Furukawa, W. Rummel, H. Andres:
Intestinale Resorption von Herzglykosiden in vitro und in vivo.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 262, 53 (1969)

Friedman, M., R. Bine:
Employment of the embryonic duck heart for the detection of minute amounts of a digitalis glycosides (Lanatoside C).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64, 162 (1947)

Friedman, M., R. Bine, S.O. Byers, C. Bland:
The renal excretion of digitoxin in the normal subject after single and continuous administration of the drug.
Circulation 2, 749 (195o)

Friedman, M., S.St. George, R. Bine, S.O. Byers, C. Bland:
Deposition and disappearance of digitoxin from the tissues of the rat, rabbit, and dog after parenteral injection.
Circulation 6, 367 (1952)

Friedman, M., S.St. George, R. Bine, S.O. Byers:
The renal excretion of digitoxin in the acute and chronic cardiac patients.
Circulation 6, 853 (1952 a)

Gault, M.H., M. Ahmed, A.L. Symes, J. Vance:
Extraction of digoxin and its metabolites from urine and their seperation by sephadex LH-2o column chromatography.
Clin. Biochem. 9, 46 (1976)

Geiling, E.M.K., F.E. Kelsey, A. Ganz, E.J. Walaszek, G.T. Okita, S. Fishman, L.B. Smith:
Biosynthesis of radioactive medically important drugs with special reference to digitoxin.
Trans. Assoc. Am. Physicians 63, 191 (195o)

Gillmann, H., F. Grosse-Brockhoff:
Die Therapie mit Herzglykosiden.
Dtsch. Med. Wochenschr. 88, 1 (1963)

Gjerdrum, K.:
Digitoxin studies. Serum concentration during digitalization, maintenance therapy and withdrawal.
Estimation of proper maintenance dose.
Acta Med. Scand. 191, 25 (1972)

Glynn, J.P., W. Bastain:
Salivary excretion of paracetamol in man.
J. Pharm. Pharmacol. 25, 42o (1973)

Gold, H.:
Pharmacologic basis of cardiac therapy.
J. Am. Med. Assoc. 132, 547 (1946)

Goldfinger, S.E.:
Bioavailability: absorption influence factors.
N. Engl. J. Med. 285, 1376 (1971)

Goldman, St., P. Probst, A. Selzer, K. Cohn:
Inefficacy of therapeutic serum levels of digoxin in controlling the ventricular rate in atrial fibrillation.
Am. J. of Cardiol. 35, 651 (1975)

Goldstein, A., L. Aronow, S.M. Kalman:
Principles of drug action. The basis of pharmacology.
Harper and Row, Publishers, New York 1969

Gorringe, J.A.L., E.M. Sproston, B. Chir:
The influence of particle size upon the absorption of drugs from the gastrointestinal tract. In: Binns, T.B. (ed.), Absorption and Distribution of Drugs. The Williams and Wilkins Comp., Baltimore 1964

Grabensee, B., U. Peters, T. Risler, F. Grosse-Brockhoff:
Digitoxin and digoxin in patients with chronic renal failure and on hemodialysis. In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 317. Bonn 1977, Springer Verlag

Graham, G., M. Rowland:
Application of salivary data to biopharmaceutical studies of salicylates.
J. Pharm. Sci. 61, 1219 (1972)

Greeff, K.:
Zum Wirkungsmechanismus der Digitalisglykoside. In:
Greeff, K., H. Bahrmann, H.F. Benthe, D. Haan, H. Kreuzer
(Hrsg.), Probleme der klinischen Prüfung herzwirksamer
Glykoside, p. 12. Kreislauf Bücherei Bd. 24. Steinkopff,
Darmstadt 1968

Greeff, K.:
Bestimmung des Blutspiegels von Digoxin, Digitoxin und
g-Strophanthin mit Hilfe radioimmunologischer Methoden.
Herz/Kreislauf 6, 145 (1974)

Greeff, K., R. Bonn:
Der zelluläre Wirkungsmechanismus von Digitalisglykosiden.
Therapiewoche 26, 4771 (1976)

Greenberger, N.J., R.P. Marc Dermott, J.F. Martin, S. Dutta:
Intestinal absorption of six tritium-labeled digitalis
glycosides in rats and guinea pigs.
J. Pharmacol. Ther. 167, 265 (1969)

Greenberger, N.J., J.H. Caldwell:
Intestinal absorption of digitalis glycosides in rats and
guinea pigs. In: Marks, B.H., A.M. Weissler (eds.), Basic
and Clinical Pharmacology of Digitalis. Charles C. Thomas
Publisher (USA) 1972

Greenwood, H., W. Snedden, R.P. Hayward, L. Landon:
The measurement of urinary digoxin and dihydrodigoxin by
radioimmunoassay and by mass spectroscopy.
Clin. Chim. Acta 62, 213 (1975)

Grosse-Brockhoff, F., K.J. Hengels, W.-P. Fritsch,
B. Grabensee, T.-U. Hausamen:
Serumdigoxin und Nierenfunktion.
Dtsch. Med. Wochenschr. 98, 1547 (1973)

Grosse-Brockhoff, F., T.-U. Hausamen:
2oo Jahre Herztherapie mit Digitalis.
Dtsch. Med. Wochenschr. 1oo, 198o (1975)

Grosse-Brockhoff, F., B. Grabensee, T.-U. Hausamen:
Glykosidbehandlung in Klinik und Praxis.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 57 (1977)

Güllner, H.-G., E.B. Stinson, D.C. Harrison, S.M. Kalman:
Correlation of serum concentrations with heart concentrations of digoxin in human subjects.
Circulation 5o, 653 (1974)

Gugler, R., H.J. Dengler:
Arzneimittelinteraktion mit oralen Anticoagulantien vom Cumarintyp.
Klin. Wochenschr. 51, 1o81 (1973)

Gugler, R., D.W. Shoeman, D.H. Huffman, J.B. Cohlmia, D.L. Azarnoff:
Pharmacokinetics of drugs in patients with the nephrotic syndrome.
J. Clin. Invest. 55, 1182 (1975)

Gugler, R., D.L. Azarnoff:
Drug protein binding and the nephrotic syndrome.
Clin. Pharmacokin. 1, 25 (1976)

Haasis, R., D. Larbig, R. Stunkat, H. Bader, H. Seboldt:
Radioimmunologische Bestimmung der Glykosidkonzentration im menschlichen Gewebe.
Klin. Wochenschr. 55, 23 (1977)

Hall, W.H., J.E. Doherty:
Tritiated digoxin XVI. Gastric absorption.
Digest. Dis. 16, 9o3 (1971)

Hausamen, T.-U., U. Peters:
Kontrollmöglichkeiten der Digitalistherapie in Praxis und Klinik.
Therapiewoche 26, 4777 (1976)

Heizer, W.D., T.W. Smith, S.E. Goldfinger:
Absorption of digoxin in patients with malabsorption syndromes.
N. Engl. J. Med. 285, 257 (1971)

Herbert, V., K.S. Lau, Ch. W. Gottlieb, Sh.J. Bleicher:
Coated charcoal immunoassay of insulin.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 25, 1375 (1965)

Herrmann, J., K. Repke:
Transformations of cardenolides by microorganisms of the intestine. In: Symposium über biochemische Aspekte der Steroidforschung, p. 115. Berlin 1969

Holtzman, J.L., R.B. Shafer, R.R. Erickson:
Methodological causes of discrepancies in radioimmunoassay for digoxin in human serum.
Clin. Chem. 2o, 1194 (1974)

Howard, D., C.I. Smith, G. Stewart, M. Vadas, D.J. Tiller, W.J. Hensley, J.G. Richards:
A prospective survey of the incidence of cardiac intoxication with digitalis in patients being admitted to hospital and correlation with serum digoxin levels.
Aust. N. Z. J. Med. 3, 279 (1973)

Huffman, D.H.:
Relationship between digoxin concentrations in serum and saliva.
Clin. Pharmacol. Ther. 17, 31o (1974)

Huffman, D.H., J.W. Crow, P. Pentikäinen, D.L. Azarnoff:
Association between clinical cardiac status, laboratory parameters, and digoxin usage.
Am. Heart J. 91, 28 (1976)

Hurn, B.A.L., J. Landon:
Antisera for radioimmunoassay. In: Kirkham, K.E., W.M. Hunter (eds.), Radioimmunoassay methods, p. 121. Churchill Livingstone 1973

Ingelfinger, J.A., P. Goldman:
The serum digitalis concentration - does it diagnose digitalis toxicity?
N. Engl. J. Med. 294, 867 (1976)

Jelliffe, R.W., D.H. Blankenhorn:
Effect of phenobarbital on digitoxin metabolism.
Clin. Res. 14, 16o (1966)

Jelliffe, R.W.:
Determination of serum digoxin by enzymatic isotopic displacement of ^{3}H digoxin from Na^{+}-K^{+} ATP ase.
Fed. Proc. 28, 6o8 (197o)

Jelliffe, R.W., J. Buell, R. Kalaba, R. Sridhar, R. Rockwell, J.G. Wagner:
An improved method of digitoxin therapy.
Ann. Int. Med. 72, 453 (197o)

Jelliffe, R.W., J. Buell, R. Kalaba:
Reduction of digitalis toxicity by computer-assisted glycoside dosage regimens.
Ann. Int. Med. 77, 891 (1972)

Joubert, P.H., F.O. Müller, D.F. Pansegrouw, P.H.T. Kleynhans:
Correlative study of serum digoxin levels and electrocardiographic measurements.
SAfr. Med. J. 49, 1177 (1975)

Kalman, S.M., T.B. Okarma:
The action of digoxin at the cell surface: a strong inference based on heart cells in tissue culture.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 242, 7o3 (1974)

Khalil, S.A.H.:
Bioavailability of digoxin in presence of antacids.
J. Pharm. Sci. 63, 1641 (1974)

Klehr, H.U., H. Otten, G. v. Unruh, G. Bodem:
Digitoxinstoffwechsel bei niereninsuffizienten Patienten.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 1656 (1977)

Klotz, U., G.R. Avant, A. Hoyumpa, S. Schenker, G.R. Wilkinson:
The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man.
J. Clin. Invest. 55, 347 (1975)

Koch-Weser, J., D.W. Duhme, D. Greenblatt:
Influence of serum digoxin concentration measurements on the frequency of digitoxicity.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 284 (1974)

Koch-Weser, J.:
The serum level approach to individualization of drug dosage.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 9, 1 (1975)

Koysooko, R., E.F. Ellis, G. Levy:
Relationship between theophylline concentration in plasma and saliva of man.
Clin. pharmacol. Ther. 15, 454 (1974)

Kramer, P., J. Horenkamp, B. Willms, F. Scheler:
Das Kumulationsverhalten verschiedener Herzglykoside.
Dtsch. Med. Wochenschr. 95, 444 (197o)

Kramer, P., F. Scheler:
Renale Eliminationskinetik verschiedener Herzglykoside.
Dtsch. Med. Wochenschr. 97, 1485 (1972)

Kramer, P., E. Quellhorst, J. Horenkamp, F. Scheler:
Dialysance und prozentuale Elimination verschiedener Herzglykoside während der Hämodialyse und Peritonealdialyse.
Klin. Wschr. 5o, 6o9 (1972)

Kramer, P., E. Köthe, J. Saul, F. Scheler:
Uraemic and normal plasma protein binding of various cardiac glycosides under "in vivo" conditions.
Europ. J. Clin. Invest. 4, 53 (1974)

Kramer, P.:
Diskussionsbemerkung zu Vortrag von Larbig, D., R. Haasis: Radiochemische Bestimmungen der Konzentration von Digoxin und Digoxinderivaten. In: Jahrmärker, H. (Hrsg.), Digitalistherapie. Beiträge zur Pharmakologie und Klinik.
Springer Verlag 1975

Kramer, P., C. Langescheid, J. Saul, E. Heuer, G. Löffler, E. Köthe, C. McIntosh, F. Scheler:
Plasma digoxin levels in anuric patients and normal subjects taking digitoxin.
Klin. Wochenschr. 55, 245 (1977)

Kramer, P., E. Stroh, D. Mathei, F. Teiwes, F. Scheler:
Increased digitalis tolerance in uremic patients.
In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 3o4. Bonn 1977 a, Springer Verlag

Kübler, W., G. Endres, P. von Smekal:
Vergleichende Untersuchungen über die Aktivität und Digitalisempfindlichkeit der Transport- ATP ase im Arbeitsmyokard und im Reizleitungssystem.
Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforschg. 36, 3o5 (197o)

Kurz, H., H.G. Neumann, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel:
Anwendung pharmakokinetischer Gesichtspunkte bei der Dosierung. In: Forth, W., D. Henschel, W. Rummel (Hrsg.), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
S. 61. B.I. Wissenschaftsverlag 1977

Kuschinsky, K., H. Lahrtz, H. Lüllmann, P.A. van Zwieten:
Accumulation and release of ^{3}H-digoxin by guinea-pig heart muscle.
Br. J. Pharmac. Chemother. 3o, 317 (1967)

Kuschinsky, K., P.A. van Zwieten:
On the cumulation of digitoxin and digitoxigenin in isolated heart muscle preparations.
J. Pharm. Pharmac. 21, 398 (1969)

Kuschinsky, K.:
Über die Bindungseigenschaften von Plasmaproteinen für Herzglykoside.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol. 262, 388 (1969)

Lage, G.L., J.L. Spratt:
Structure-acitivity correlation of the lethality and central effects of selected cardiac glycosides.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 152, 5o1 (1966)

Lahrtz, H.G., H.M. Reinold, P.A. van Zwieten:
Serumkonzertration und Ausscheidung von ^{3}H-Digitoxin beim Menschen unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Klin. Wochenschr. 47, 695 (1969)

Larbig, D., K. Kochsiek, Chr. Schrader:
Klinische Aspekte der radioimmunchemischen Bestimmung der Serum-Digoxinkonzentration.
Dtsch. Med. Wochenschr. 97, 139 (1972)

Larbig, D., R. Haasis, K. Kochsiek:
Die Glykosidkonzentration und ihre klinische Bedeutung.
Forum cardiologicum 15, 32 (1978), Boehringer Mannheim

Lasagna, L.:
How useful are serum digitalis measurements?
N. Engl. J. Med. 294, 898 (1976)

Lauterbach, F.:
Enterale Resorption, biliäre Ausscheidung und entero-hepatischer Kreislauf von Herzglykosiden bei der Ratte.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol. 247, 391 (1964)

Lauterbach, F.:
Enterale Resorption und Sekretion herzwirksamer Glykoside.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 33 (1977)

Leach, C.N., R.E. Peterson, D.S. Lukas:
Metabolism of digitoxin in man.
Clin. Res. 14, 254 (1966)

Lehninger, A.L.:
Biochemistry. Worth Publishers, Inc. New York, 1976

Levy, G.:
Pharmacokinetic control and clinical interpretation of steady-state blood levels of drugs.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 13o (1974)

Lichey, J., R. Schröder, N. Rietbrock:
Aktuelle Plasma-Digoxinkonzentration von Patienten bei Krankenhausaufnahme.
Dtsch. Med. Wochenschr. 1o2, 1o56 (1977)

Lieberman, S., B.F. Erlanger, S.M. Beiser, F.J. Agate, Jr:
Steroid-protein conjugates: their chemical, immunochemical, and endocrinological properties.
Recent Progr. Hormone Res. 15, 165 (1959)

Lindenbaum, J., M.H. Mellow, M.O. Blackstone, V.P. Butler:
Variation in biologic availability of digoxin from four preparations.
N. Engl. J. Med. 285, 1344 (1971)

Lindenbaum, J., V.P. Butler, J.E. Murphy, R.M. Cresswell:
Correlation of digoxin-tablet dissolution-rate with biological availability.
Lancet 1215/1973

Lindenbaum, J.:
Greater bioavailability of digoxin solution in capsules. Studies in the postprandial state.
Clin. Pharmacol. Ther. 21, 278 (1976)

Löwenstein, J.M.:
A method for measuring plasma levels of digitalis glycosides.
Circulation 31, 228 (1965)

Löwenstein, J.M., E.M. Corril:
An improved method for measuring plasma and tissue concentrations of digitalis glycosides.
J. Lab. Clin. Med. 67, 1o48 (1966)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

Luchi, R.J., J.W. Gruber:
Unusually large digitalis requirements.
Am. J. Med. 45, 322 (1968)

Lüllmann, H., T. Peters:
Enteric absorption rate of different glycosides and the dependency upon intestinal blood flow. In: Storstein, O. (ed.), Symposium on Digitalis 1973, p. 21o. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo

Lukas, D.S., R.E. Peterson:
Double isotope dilution derivate assay of digitoxin in plasma, urine, and stool of patients maintained on the drug.
J. Clin. Invest. 45, 782 (1966)

Lukas, D., A.G. De Martino:
Binding of digitoxin and some related cardenolides to human plasma proteins.
J. Clin. Invest. 48, 1o41 (1969)

Lukas, D.S.:
The pharmacokinetics and metabolism of digitoxin in man. In: Storstein, O. (ed.), Symposium on Digitalis 1973, p. 84. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo

Lukas, D.S.:
The role of the liver in the chemical transformation of digitoxin. In: Storstein, O. (ed.), Symposium on Digitalis 1973 a, p. 192. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo

Mandel, H.G.:
Pathways of drug biotransformation: biochemical conjugations. In: LaDu, B.N., H.G. Mandel, E.L. Way (eds.), Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 1971

Manninen, V. A. Apajalahti, H. Simonen, P. Reissell:
Effect of propantheline and metoclopramide on absorption of digoxin.
Lancet 19/1973, 1118

Marcus, F.I., G.G. Kapadia:
The metabolism of tritiated digoxin in cirrhotic patients.
Gastroenterology 47, 517 (1964)

Marcus, F.I., L. Burkhalter, C. Cuccia, J. Pavlovich, G.G. Kapadia:
Administration of tritiated digoxin with and without a loading dose. A metabolic study.
Circulation 34, 865 (1966)

Marcus, F.I., A. Peterson, A. Salel, J. Scully, G.G. Kapadia:
The metabolism of tritiated digoxin in renal insufficiency in dogs and man.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 152, 372 (1966 a)

Marcus, F.I., G.G. Kapadia, C. Goldsmith:
Alteration of the body distribution of tritiated digoxin by acute hyperkalemia in the dog.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 165, 136 (1969)

Marcus, F.I.:
The role of the liver in the transformation and excretion of digoxin. In: Storstein, O. (ed.), Symposium on Digitalis 1973, p. 2oo. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo

Matsui, H., A. Schwartz:
Kinetic analysis of ouabain- K^+ and Na^+ interaction on the Na^+, K^+- dependant adenosine triphosphatase from cardiac tissue.
Biochem. Biophys. Res. Commun 25, 147 (1966)

Moe, G.K., A.E. Farah:
Digitalis and allied cardiac glycosides. In: Goodman, L.S., A. Gilman (eds.), The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th. Mac Millan, New York, 1975

Morrison, J., T. Killip:
Radioimmunoassay of digitoxin.
Clin. Res. 18, 353 (1972)

Netter, K.J.:
Grundlagen des Arzneimittelstoffwechsels.
Arzneim. Forschg. (Drug Research) 22, 285 (1972)

Ochs, H., G. Bodem, P.K. Schäfer, G. Kodrat, H.J. Dengler:
Absorption of digoxin from the distal parts of the intestine in man.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 9, 95 (1975)

Odar-Cederlöf, I., O. Borga:
Impaired plasma protein binding of phenytoin in uremia and displacement effect of salicylic acid.
Clin. Pharmacol. Ther. 2o, 36 (1976)

Odell, W.D., G. Abraham, H.R. Raud, R.S. Swerdloff, D.A. Fisher:
Influence of immunization procedures in the titer, affinity and specificity of antisera to glycopolypeptides.
Acta Endocrinol.(Copenhagen). Suppl. 142, 54 (1969)

Ogilvie, R.I., J. Ruedy:
An educational program in digitalis therapy.
J. Am. Med. Assoc. 222, 5o (1972)

Okarma, T.B., P. Tramell, S.M. Kalman:
The surface interaction between digoxin and cultured heart cells.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 559 (1972)

Okita, G.T., F.E. Kelsey, P.J. Talso, L.B. Smith, E.M.K. Geiling:
Studies on the renal excretion of radioactive digitoxin in human subjects with cardiac failure.
Circulation 7, 161 (1953)

Okita, G.T., P.J. Talso, J.H. Curry, F.D. Smith, E.M.K. Geiling:
Metabolic fate of radioactive digitoxin in human subjects.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 115, 371 (1955)

Okita, G.T.:
Metabolism of radioactive cardiac glycosides.
Pharmacologist 6, 45 (1964)

Okita, G.T.:
Species difference in duration of action of cardiac glycosides.
Fed. Proc. 26, 1125 (1967)

Oliver, G.C., B.M. Parker, D.L. Brasfield, C.W. Parker:
The measurement of digitoxin in human serum by radio-immunoassay.
J. Clin. Invest. 47, 1o35 (1968)

Oliver, G.C., J. Cooksey, C. Witte, M. Witte:
Absorption and transport of digitoxin in the dog.
Circ. Res. 29, 419 (1971)

Peck, C.C., L.B. Sheiner, C.M. Martin, D.T. Combs, K.L. Melmon:
Computer-assisted digoxin therapy.
N. Engl. J. Med. 289, 441 (1973)

Peters, U., T.-U. Hausamen, F. Grosse-Brockhoff:
Therapie mit Digitoxin unter Kontrolle des Serum-Digitoxinspiegels.
Dtsch. Med. Wochenschr. 99, 1701 (1974)

Peters, U., K.-J. Hengels, T.-U. Hausamen, F. Grosse-Brockhoff:
Einfluß von Rifampicin auf den Metabolismus des Digitoxins.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 81, 1675 (1975)

Peters, U., T.-U. Hausamen, F. Grosse-Brockhoff:
Digitoxin disposition under rifampicin treatment. In:
Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 401. Bonn 1977. Springer Verlag

Peters, U., B. Grabensee, T.-U. Hausamen, F. Grosse-Brockhoff:
Pharmakokinetik von Digitoxin bei chronischer Niereninsuffizienz.
Dtsch. Med. Wochenschr. 102, 109 (1977 a)

Peters, U., L. Falk, S.M. Kalman:
Metabolism of digoxin in man: high dosage associated with increased reduction of the double bond in the 17-β-lactone ring of digoxin.
Fed. Proc. 36/3, 938 (1977 b)

Peters, U., C. Funke, T.-U. Hausamen, W. Staib:
Quantitative studies on acid hydrolysis of digitoxin.
Arzneim.-Forschg. (Drug Research) 28/I, 750 (1978).

Peters, U.; S.M. Kalman:
Dihydrierte Metaboliten des Digoxins: klinische Bedeutung und Nachweisverfahren.
Z. Kardiol. 67, 342 (1978 a)

Peters, U., L. Falk, S.M. Kalman:
Digoxin metabolism in patients.
Arch. Intern. Med. (im Druck)

Peters, U., W.-P. Fritsch, B. Grabensee:
Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Digitoxin bei Patienten mit Leberzirrhose.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 84, im Druck, 1978 b

Pusch, Fr.:
Über das adsorptive Verhalten von Digitaliskörpern und Strophantin an verschiedenen Substanzen mit und ohne Zusatz von Eiweißkörpern.
Arch. Exp. Path. Pharmak. 177, 564 (1935)

Rabitzsch, G.:
Trennung der Herzglykoside Digitoxin und Digoxin von ihren 2o, 22-Dihydroderivaten durch Mehrfach-Dünnschicht-chromatographie an Cellulose-Schichten.
J. Chromatogr. 35, 122 (1968)

Rasmussen, K., J. Jervell, O. Storstein:
Clinical use of a bio-assay of serum digitoxin activity.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 3, 236 (1971)

Rasmussen, K., J. Jervell, L. Storstein, K. Gjerdrum:
Digitoxin kinetics in patients with impaired renal function.
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 6 (1971 a)

Reidenberg, M.M., I. Odar-Cederlöf, von Bahr, O. Borga, F. Sjöqvist:
Protein binding of diphenylhydantoin and desmethylimipramine in plasma from patients with poor renal function.
N. Engl. J. Med. 285, 264 (1971)

Repke, K., S. Klesczewski, L. Roth:
Über Spaltung und Hydroxylierung von Digitoxin bei der Ratte.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol. 237, 34 (1959)

Repke, K., L. Roth, S. Klesczewski:
Die Bis- und Mono-digitoxoside des Digitoxigenins und Digoxigenins: Metaboliten des Digitoxins.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol. 237, 155 (1959 a)

Repke, K.:
Metabolism of cardiac glycosides. In: Wilbrandt, W. (ed.), New aspects of cardiac glycosides. First International Pharmacological Meeting 1961, New York 1963, Pergamon Press. Inc.

Repke, K.:
Über das Stoffwechsel-Schicksal von Digitoxin und Dihydro-digitoxin.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol. 241, 165 (1961 a)

Repke, K., L.T. Samuels:
Enzymatic basis for epimerization of cardiotonic steroids at carbon 3 in rat liver.
Biochemistry 3, 689 (1964)

Repke, K., H.J. Portius:
Analysis of structure activity relationships in cardio-active compounds on the molecular level.
Scientiae Pharmaceuticae-I. Proc. 25. Congr. Pharmaceutical Sciences, 39, Prag 1965

Reuning, R.H., R.A. Sams, R.E. Notari:
Role of pharmacokinetics in drug dosage adjustment. I. Pharmacologic effects kinetics and apparent volume of distribution of digoxin.
J. Clin. Pharmacol. 13, 127 (1973)

Rietbrock, N., U. Abshagen:
Stoffwechsel und Pharmakokinetik der Lanataglykoside beim Menschen.
Dtsch. Med. Wochenschr. 98, 117 (1973)

Rietbrock, N., H.F. Vöhringer:
Metabolism and excretion of ^{3}H-digitoxin in the rat.
Biochem. Pharmacol. 23, 2567 (1974)

Rietbrock, N., H.F. Vöhringer, J. Kuhlmann:
Der Metabolismus herzwirksamer Glykoside.
Herz/Kreislauf 9, 825 (1977)

Risler, T., B. Grabensee, F. Grosse-Brockhoff:
Eliminationskinetik und Dosierung von Digoxin bei Patienten mit Niereninsuffizienz.
Dtsch. Med. Wochenschr. 99, 213o (1974)

Risler, T., B. Grabensee, F. Grosse-Brockhoff:
EKG-Veränderungen und Digoxin-Serumkonzentration bei Digitalisintoxikationen.
Dtsch. Med. Wochenschr. 100, 821 (1975)

Rudman, D., Th. J. Bixler, A.E. Del Rio:
Effect of free fatty acids on binding of drugs by bovine serum albumin, by human serum albumin and by rabbit serum.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 261 (1971)

Scheler, F., W. Wigger, D. Höffler, E. Quellhorst:
Steigerung der Digitalistoxizität bei eingeschränkter Niereninsuffizienz.
Dtsch. Med. Wochenschr. 9o, 1614 (1965)

Schmiedeberg, O.:
Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie zu Strassburg.
Arch. Exp. Path. Pharm. 16, 149 (1883)

Schneider, J., A. Ruiz-Torres:
Bedeutung des Körpergewichts für die Therapie mit Digoxin und Digoxinderivaten.
Dtsch. Med. Wochenschr. 1o2, 116 (1977)

Scholtan, W., K. Schlossmann, H. Rosenkranz:
Bestimmung der Eiweißbindung von Digitalis-Präparaten mittels der Ultrazentrifuge.
Arzneim. Forsch. 16, 1o9 (1966)

Schwarze, P., H. Hittinger:
Bestimmung der Einzeldosierung und Auflösungsgeschwindigkeit von Digitoxin aus Tabletten und Dragees, 2. Mitteilung.
Pharm. Ind. 11, 794 (1974)

Shannon, J.A.:
The study of antimalarials and antimalarial acitivity in the human malarias.
Harvey Lect. Ser. 41, 43 (1945/46)

Shapiro, W., K. Narahara, K. Taubert:
Relationship of plasma digitoxin and digoxin to cardiac response following intravenous digitalization in man.
Circulation 42, 1o65 (197o)

Shapiro, W., K. Taubert, K. Narahara:
Nonradioactive serum digoxin and digitoxin levels.
Arch. Intern. Med. 13o, 31 (1972)

Shaw, W.:
Radioimmunoassay of digitoxin: effect of albumin.
Clin. Chem. 21, 636 (1975)

Shaw, T.R.D.:
Bioavailability studies: their influence on clinical use of digitalis. In: Bodem, G, H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 187. Bonn 1977. Springer Verlag

Shoeman, D.W., D.L. Azarnoff:
The alteration of plasma proteins in uremia as reflected in their ability to bind digitoxin and diphenylhydantoin.
Pharmacology 7, 169 (1972)

Smith, T.W., V.P. Butler, E. Haber:
Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay.
N. Engl. J. Med. 281, 1212 (1969)

Smith, T.W., E. Haber:
Digoxin intoxication: the relationship of clinical presentation to serum digoxin concentration.
J. Clin. Invest. 49, 2377 (197o)

Smith, T.W.:
Radioimmunoassay for serum digitoxin concentration: methodology and clinical experience.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 175, 352 (197o)

Smith, T.W., V.P. Butler, E. Haber:
Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin.
Biochemistry 9, 331 (197o)

Smith, T.W., K.M. Skubitz:
Kinetics of interactions between antibodies and haptens.
Biocheemistry 14, 1496 (1975)

Smith, T.W.:
Digitalis toxicity: epidemiology and clinical use of serum concentration measurements.
Am. J. Med. 58, 47o (1975)

Smith, T.W., L.H. Green, G.D. Curfman:
Clinical interpretation of cardiac glycosides.
In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 292. Bonn 1977. Springer Verlag

Solomon, H., S. Reich, Z. Gaut, R. Pocelinko, W. Abrams:
Induction of the metabolism of digitoxin in man by phenobarbital.
Clin. Res. 19, 356 (1971)

Solomon, H.M., W.B. Abrams:
Interactions between digitoxin and other drugs in man.
Am. Heart J. 83/2, 277 (1972)

Storstein, L.:
The influence of renal function on the pharmacokinetics of digitoxin. In: Storstein, O. (ed.), Symposium on Digitalis, p. 158. Gyldendal Norsk Forlag, Oslo 1973

Storstein, L.:
Studies on digitalis. I. Renal excretion of digitoxin and its cardioactive metabolites.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 14 (1974)

Storstein, L.:
Studies on digitalis. II. The influence of impaired renal function on the renal excretion of digitoxin and cardioactive metabolites.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 25 (1974 a)

Storstein, L., J. Amlie:
Digitoxin pharmacokinetics in chronic active hepatitis.
Digestion 12, 353 (1975)

Storstein, L.:
Studies on digitalis. III. Biliary excretion and enterohepatic circulation of digitoxin and its cardioactive metabolites.
Clin. Pharmacol. Ther. 17, 313 (1975)

Storstein, L.:
Studies on digitalis. IV. A method for thin-layer chromatographic separation and determination of digitoxin and cardioactive metabolites in human blood and urine.
J. Chromatogr. 117, 87 (1976)

Storstein, L.:
Studies on digitalis. V. The influence of impaired renal function, hemodialysis, and drug interaction on serum protein binding of digitoxin and digoxin.
Clin. Pharmacol. Ther. 2o, 6 (1976 a)

Storstein, L., H. Janssen:
Studies on digitalis. VI. The effect of heparin on serum protein binding of digitoxin and digoxin.
Clin. Pharmacol. Ther. 2o, 15 (1976)

Storstein, L.:
Studies on digitalis. VII. Influence of nephrotic syndrome on protein binding, pharmacokinetics, and renal excretion of digitoxin and cardioactive metabolites.
Clin. Pharmacol. Ther. 20, 158 (1976 b)

Storstein, L.:
Digitoxin pharmacokinetics in patients with renal disease.
In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 292. Bonn 1977. Springer Verlag

Storstein, L.:
Studies on digitalis. VIII. Digitoxin metabolism on a maintenance regimen and after a single dose.
Clin. Pharmacol. Ther. 21, 125 (1977 a)

Storstein, L., J. Amlie:
Studies on digitalis. IX. Some kinetic aspects of digitoxin metabolism.
Clin. Pharmacol. Ther. 21, 255 (1977)

Storstein, O., V. Hansteen, L. Hatle, L. Hillestad, L. Storstein:
Studies on digitalis. XIII. A prospective study of 649 patients on maintenance treatment with digitoxin.
Am. Heart J. 93, 434 (1977)

Strobach, H., K. Greeff, F.A. Horster, W. Wildmeister:
Radioimmunologische Glykosidbestimmungen nach Gabe von Digoxin und Digoxin-Derivaten beim Menschen.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 113 (1972)

Sugden, D., M. Ahmed, M.H. Gault:
Fractionation of tritiated digoxin and dihydrodigoxin with DEAE-Sephadex LH-20.
J. Chromatogr. 121, 401 (1976)

Tamm, Ch.:
The stereochemistry of the glycosides in relation to biological activity. In: Wilbrandt, W. (ed.), New aspects of cardiac glycosides. First International Pharmacological Meeting 1961. New York 1963, Pergamon Press Inc.

The United States Pharmacopoeia, IXX, 143 (1975)

Thomson, P.D., K.L. Melmon, J.A. Richardson, V. Cohn, W. Steinbrunn, R. Cudihee, M. Rowland:
Lidocaine pharmacokinetics in advanced heart failure, liver disease, and renal failure in humans.
Ann. Intern. Med. 78, 499 (1973)

Verspohl, E.:
Entwicklung radioimmunologischer Methoden zur Bestimmung von Glykosiden des Digitoxigenins, g- Strophanthins und k- Strophanthidins mit Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Digitoxins und g- Strophanthins.
Inauguraldissertation, Düsseldorf 1973

Vesell, E.S.:
Factors causing interindividual variations of drug concentrations in blood.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 135 (1974)

Vick, R.L., J.B. Kahn, G.H. Acheson:
Effects of dihydro-ouabain, dihydrodigoxin and dihydrodigitoxin in the heart-lung preparation of the dog.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 121, 33o (1957)

Vöhringer, H.F., N. Rietbrock:
Metabolism and excretion of digitoxin in man.
Clin. Pharmacol. Ther. 16, 796 (1974)

Vöhringer, H.F., N. Rietbrock, P. Spurny, J. Kuhlmann, R. Baethke:
Dispositon of digitoxin in renal failure.
Clin. Pharmacol. Ther. 19, 387 (1976)

Vöhringer, H.F., N. Rietbrock:
Pharmacokinetics and metabolism of digitoxin in the human.
In: Bodem, G., H.J. Dengler (eds.), International Symposium on Cardiac Glycosides, p. 64. Bonn 1977, Springer Verlag

Vöhringer, H.F., H.M. Wogenstein, N. Rietbrock:
Die biologische Verfügbarkeit von Digitoxin.
Fortschr. Med. 38, 2323 (1977)

Vöhringer, H.F.:
Habilitationsschrift. Berlin 1978

Voshall, D.L., L. Hunter, H.J. Grady:
Effect of albumin on serum radioimmunoassays.
Clin. Chem. 21, 4o2 (1975)

Wagner, J.G., J.D. Yates, P.W. Willis III, Jr., E. Sakmar, R.G. Stoll:
Correlation of plasma levels of digoxin in cardiac patients with dose and measures of renal function.
Clin. Pharmacol. Ther. 15, 291 (1974)

Wagner, J.G.:
Fundamentals of clinical pharmacokinetics.
Drug Intelligence Publications, Inc. Hamilton, Illinois 1975

Watson, E., S.M. Kalman:
Assay of digoxin in plasma by gas chromatography.
J. Chromatogr. 56, 2o9 (1971)

Watson, E., P. Tramell, S.M. Kalman:
Identification of submicrogram amounts of digoxin, digitoxin and their metabolic products. Isolation by chromatography and preparation of derivatives for assay by electron capture detector.
J. Chromatogr. 69, 157 (1972)

Watson, E., D.R. Clark, S.M. Kalman:
Identification by gas chromatography-mass spectroscopy of dihydrodigoxin. A metabolite of digoxin in man.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 184, 424 (1973)

Weintraub, M., W.Y.W. Au, L. Lasagna:
Compliance as a determinant of serum digoxin concentration.
J. Am. Med. Assoc. 224, 481 (1973)

Weissler, A.M., R.P. Lewis, R.F. Leighton, Ch. A. Bush:
Comparative responses to the digitalis glycosides in man.
In: Marks, B.H., A.M. Weissler (eds.), Basic and Clinical Pharmacology of Digitalis. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, USA, 1972

Wilkinson, G.R., S. Schenker:
Drug disposition and liver disease.
Drug Metab. Rev. 4(2), 139 (1975)

Wilson, W.S., J.H. Tolbert, W. DiGuilio:
Plasma digitoxin levels and serial left ventricular ejection times after a digitalizing dose of digitoxin.
Am. J. Cardiol. 26, 162 (197o)

Wirth, K.E., J.C. Frölich, J.W. Hollifield, F.C. Falkner, B.S. Sweetman, J.A. Oates:
Metabolism of digitoxin in man and its modification by spironolactone.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 9, 345 (1976)

Withering, W.:
Bericht über den Fingerhut und seine medizinische Anwendung mit praktischen Bemerkungen über Wassersucht und andere Krankheiten. Nach der englischen Ausgabe von 1785 ins Deutsche übersetzt von F. Johannessohn (C.F. Boehringer, Mannheim 1929 und 1964)

Wood, J.H., V.P. Bhavnagri, J.D. Proctor, E.F. Evans, M.F. Martin, K.L. Kingan:
Bioavailability of commercial digitoxin preparations.
J. Clin. Pharmacol. 15, 568 (1975)

Zettner, A.:
Principles of competitive binding assays (saturation analyses). I. Equilibrium techniques.
Clin. Chem. 19/7, 699 (1973)

Zettner, A., P.E. Duly:
Principles of competitive binding assays (saturation analyses). II. Sequential saturation.
Clin. Chem. 2o, 5 (1974)

Zilly, W., E. Richter, N. Rietbrock:
Pharmacokinetics and metabolism of digoxin- and ß-methyl-digoxin-12α ^{3}H in patients with acute hepatitis.
Clin. Pharmacol. Ther. 17, 3o2 (1975)

Zilly, W., P. Frank, E. Richter, N. Rietbrock:
Die Elimination von Digitoxin bei Leberkrankheiten.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 882, 1663 (1976)

Zilly, W., E. Richter, N. Rietbrock:
Pharmakokinetik von Digoxin und Methyldigoxin bei Patienten mit akuter Hepatitis.
Med. Klin. 73, 463 (1978)